



DOCTORADO EN NEUROCIENCIA UAM

---

***ARQUITECTURA Y CONEXIONES  
TALAMOCORTICALES DEL NÚCLEO PULVINAR  
MEDIAL EN EL MONO TITÍ COMÚN  
(*CALLITHRIX JACCHUS*)***

TESIS DOCTORAL

Autora: María Angélica Córdoba Claros

Directores: José Pablo Rubio Garrido y Francisco Clascá Cabré

Afiliación: *Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia, Facultad  
de Medicina UAM, Madrid.*

Madrid, 21 de Junio de 2017



**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia**

Francisco Clascá Cabré, Catedrático y José Pablo Rubio Garrido, Profesor contratado doctor, pertenecientes al departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACEN CONSTAR:

Que María Angélica Córdoba Claros ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral “Arquitectura y conexiones talamocorticales del núcleo pulvinar medial en el mono tití común (*Callithrix jacchus*)”, que ha terminado satisfactoriamente.

Revisado el presente trabajo, quedamos conformes con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta efectos oportunos, lo firmamos en Madrid a 20 de junio de 2017.

Fdo. José Pablo Rubio Garrido

Fdo. Francisco Clascá Cabré

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos MICINN BFU2010-19695 (España) y PHB2012-0011-PC CAPES (Brasil)

## RESUMEN

La división medial del complejo pulvinar (PulM) del tálamo, ocupa gran parte del volumen del tálamo posterior y ha llegado a conseguir su máxima expansión en humanos. A diferencia del resto de componentes del complejo pulvinar, el PulM no está involucrado directamente en el procesamiento visual. Se ha descrito ampliamente que conecta con múltiples áreas corticales localizadas en distritos de las cortezas ventral frontal, cingular, insular y temporal. Sin embargo, su arquitectura y su organización no ha sido investigada en detalle.

Utilizamos inyecciones de dextranos biotinilados en PulM para marcar anterógradamente los procesos axonales de las neuronas talamocorticales. A continuación, mapeamos la distribución tangencial global de las proyecciones marcadas en una reconstrucción bidimensional de la superficie cortical y realizamos reconstrucciones de la distribución laminar de los axones que provienen de pequeños grupos a lo largo del eje anteroposterior. Además, analizamos el recorrido subcortical de las proyecciones axonales del PulM. Posteriormente, por medio del fraccionador óptico realizamos la estimación estereológica del número total de varicosidades dentro de un transecto localizado en la región de máxima inervación en áreas corticales seleccionadas. También, realizamos la medición de las áreas de máxima proyección de las varicosidades axonales localizadas en la capa 1 y capas 3 y 4. Por último, para conseguir mayor precisión en la delimitación hodológica e investigar la existencia de neuronas que inervan simultáneamente varias áreas corticales dentro del PulM, inyectamos trazadores retrógrados en varias regiones de las cortezas temporal inferior, frontal ventral y parietal posterior.

Hemos observado que, dentro del PulM, se pueden identificar tres sectores hodológicos que solapan parcialmente y pueden ser reconocidos en función del conjunto de dianas corticales que inervan. El sector rostralateral está formado por poblaciones neuronales densamente compactadas que arborizan en varios focos de terminaciones axonales localizados en las cortezas parietal posterior, cingular posterior, frontal ventral y temporal inferior. El sector medial, presenta poblaciones que proyectan a las cortezas prefrontal medial y temporopolar. Por último, el sector caudal presenta exclusivamente somas que proyectan a las cortezas temporal inferior y ventral. En todos los depósitos estudiados, observamos que el patrón de distribución radial se localiza principalmente en las capas 3b y 4 y en la capa 1. Finalmente, la media del área máxima de proyección de las varicosidades se encuentra alrededor de  $1\mu\text{m}^2$  con pequeñas variaciones entre áreas y capas.



## Abstract

The medial division of the pulvinar complex of the thalamus (MPul) is a massive structure in higher primates, particularly in humans. Unlike the rest of the pulvinar, MPul is not directly involved in visual processing and, as reported, it is connected to a variety of high order frontal, parietal, cingulate, insular and temporal cortical areas. The wiring of these multiple connections and their organization within MPul has not been investigated in detail.

We used microiontophoretic injections of biotinylated dextran amine (BDA) in MPul to anterogradely label the axonal arborizations of thalamocortical neurons. Then, we mapped the whole tangential distribution in a reference flat cortical map and the laminar distribution of axons arising from small MPul neuronal clusters along its anteroposterior axis. Also, we analyzed MPul axon trajectories throughout the cerebral white matter. Subsequently, by means of optical fractionator we stereologically estimated the varicosity number within transects in selected cortical areas. Besides, we measured the maximal projection area of the axonal varicosities using camera lucida. To achieve more precision in the delimitation of the hodological sectors of MPul we made retrograde tracer deposits to map the global topography of the pulvinocortical populations that innervated several locations in frontal ventral, parietal posterior and temporal inferior cortices.

We show that, within MPul, three partially overlapping sectors can be distinguished according to their axonal targets in the cerebral cortex. First, the rostromedial sector is formed by densely packed but segregated neuronal populations which axons arborized to several terminal foci located in frontal, parietal, cingulate, or temporal areas. Second, the medial sector is formed by medial frontal and temporopolar projecting neurons. Third, the caudal sector has more prevalence of temporoventral projecting somas. In all studied deposits, we saw that the laminar distribution pattern is mainly in layers 3b and 4 and layer 1. The varicosities' maximal projection area is around  $1 \mu\text{m}^2$ , with small differences between areas and laminae.

These features are consistent with the notion that PulM is a key neural hub in the neural networks that allows complex multisensory-guided social behaviors.

# Lista de figuras

Figura 1. Topografía tangencial de las conexiones talamocorticales en la corteza cerebral. ....	5
Figura 2. Primeras descripciones de los sistemas tálamo-corticales. ....	6
Figura 3. Clasificación de los núcleos talámicos en función del grado de dispersión o especificidad de sus proyecciones en corteza. ....	9
Figura 4. Sistema talámico de proyección a capa 1. ....	11
Figura 5. Teoría de la organización de las proyecciones talámicas en sistemas tipo matriz (rosa) o “core” (color azul). ....	12
Figura 6. Representaciones esquemáticas de los fenotipos de neuronas tálamo-corticales descritos actualmente. ....	16
Figura 7. Vías transtalámicas corticocorticales y vías corticocorticales directas. ....	19
Figura 8. Secciones coronales del complejo pulvinar de macaco tomadas del atlas de Olszewski (1952). ....	22
Figura 9. Relación para características de conectividad y quimioarquitectónicas de los componentes del pulvinar inferior de macaco. ....	27
Figura 10. Especificidad bioquímica de poblaciones TC inmunopositivas para acetilcolinesterasa que proyectan a corteza orbitofrontal y temporal superior. ....	28
Figura 11. Reconstrucciones de somas y árboles dendríticos de neuronas del pulvinar teñidas con la técnica de Golgi. ....	29
Figura 12. Resumen de la conectividad del complejo pulvinar. ....	32
Figura 13. Perfil de cantidad de granos de plata contados tras un depósito de aminoácidos tritiados en pulvinar medial en el área prefrontal de macaco. ....	35
Figura 14. Reconstrucción bidimensional de la superficie neocortical de macaco (macaca fascicularis). ....	37
Figura 15. Proyecciones del PulM hacia áreas seleccionadas de la corteza prefrontal. ....	38
Figura 16. Resumen de la topografía de las proyecciones TC desde PulM y PulL hacia el lóbulo prefrontal en macaco. ....	40
Figura 17. Representación diagramática de las proyecciones del pulvinar al lóbulo temporal. ....	44

Figura 18. Resumen de la topografía de las proyecciones TC desde PulM y PulL hacia el lóbulo temporal en macaco.....	46
Figura 19. Resumen de la topografía de las proyecciones TC desde PulM y PulL hacia el lóbulo temporal en macaco.....	51
Figura 20. Tractos implicados en el papel del complejo pulvinar en el lenguaje. ....	60
Figura 21. Representación en dos dimensiones de la superficie de la neocorteza del tití común. ....	84
Figura 22. Delimitación inmunohistoquímica del complejo pulvinar. ....	97
Figura 23. Resolución del marcado de los axones TC tras realizar depósitos restringidos de BDA en PulM.....	98
Figura 24. Localización de los depósitos anterógrados.....	101
Figura 25. Caso modelo con depósito en PulM que presenta marcaje en lóbulos prefrontal, parietal y temporal. ....	103
Figura 26. Mapas planos de casos con patrón en lóbulos parietal, temporal y prefrontal. ....	107
Figura 27. Representación de un experimento de trazado anterógrado en un caso tipo que exhibe un patrón de innervación restringido al lóbulo temporal.....	110
Figura 28. Distribución tangencial de casos con axones marcados restringido en lóbulo temporal.....	112
Figura 29. Representaciones del marcado axonal en corteza obtenido en el caso 14dx.....	114
Figura 30. Distribución tangencial del marcado cortical en los casos con patrón principalmente occipital.....	116
Figura 31. Análisis distribución tangencial del marcado axonal en el caso con depósito en PulA. ....	117
Figura 32. Análisis distribución marcado axonal en el caso con depósito en Li-PulM. ....	120
Figura 33. Localización del depósito en tálamo y distribución tangencial de los axones marcados en corteza del caso 12izq. ....	121
Figura 34. Perfiles de distribución de las varicosidades axonales en los transectos en lo que se ha realizado la estimación.....	126
Figura 35. Medias y desviaciones estándar de los datos estereológicos por BIN agrupados en las capas corticales que les corresponden. ....	129
Figura 36. Comparación del tamaño de las varicosidades en la capa 1 y en capas intermedias de las cortezas parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventrolateral. ...	131

Figura 37. Localización de los somas marcados retrógradamente en PulM tras realizar depósitos de trazadores en corteza prefrontal ventrolateral. ....	134
Figura 38. Localización de los somas marcados retrógradamente en PulM tras realizar depósitos de trazadores en cortezas de la corteza parietal posterior.....	136
Figura 39. Localización de los somas marcados retrógradamente en PulM tras realizar depósitos de trazadores en cortezas del lóbulo temporal inferior. ....	139
Figura 40. Resumen de la topografía de las proyecciones desde PulM a regiones de los lóbulos parietal, prefrontal y temporal.....	141
Figura 41. Análisis de la colocación en PulM de trazadores retrógrados aplicados en diferentes regiones corticales. ....	143
Figura 42. Variación del patrón de distribución tangencial de los plexos intracorticales de axones marcados de dos casos rostrales y tres caudales dentro del PulM. ....	152
Figura 43. Comparación de los patrones de distribución tangencial obtenidos a partir de los depósitos dos depósitos en PulM versus un depósito en Pula (límite rostral), y un depósito en PulL (límite lateral).....	157
Figura 44. Sectores hodológicos de las relaciones entre el PulM y distintas regiones de la corteza cerebral. ....	165

# Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades de las vías “driver” (clase 1) y moduladoras (clase 2). EPSPs (potenciales postsinápticos excitatorios).....	18
Tabla 2. Subdivisiones arquitectónicas del complejo pulvinar.....	24
Tabla 3. Referencias bibliográficas de las aferencias del PulM al lóbulo prefrontal.....	39
Tabla 4. Lista con las referencias y otras características de estudios realizados de las conexiones TC en el lóbulo temporal.....	43
Tabla 5. Referencias bibliográficas de conexiones TC con el lóbulo parietal y cortezas cingular e insular.....	48
Tabla 6. Parámetros estereológicos utilizados .....	87
Tabla 7. Casos analizados con los trazadores inyectados y su localización en cada hemisferio. ....	93
Tabla 8. Resumen de la distribución cortical y subcortical de los axones marcados en los experimentos de trazado anterógrado analizados. ....	122
Tabla 9. Número de varicosidades estimadas por BIN en regiones de la corteza parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventrolateral .....	127
Tabla 10. Porcentaje de varicosidades en cada capa por área ( $\%N_{\text{capa}}$ ) y ratio de la densidad de varicosidades por capa con respecto a la densidad total ( $N_{\text{vcapa}}/N_{\text{vtotal}}$ ) .....	129

# Lista de abreviaturas

1/2: áreas corticales 1 y 2	3b: área cortical 3b (somatosensorial)
10: área cortical 10	45: área cortical 45
11: área cortical 11	46D: área cortical 46, parte dorsal
13a: área cortical 13a	46V: área cortical 46, parte ventral
13b: área cortical 13b	47L: área cortical 47, parte lateral
13L: área cortical 13, parte lateral	47M: área cortical 47, parte medial
13M: área cortical 13, parte medial	47O: área cortical 47, parte orbital
14C: área cortical 14, parte caudal	4ab: área cortical 4, partes a y b (motor primario)
14R: área cortical 14, parte rostral	4c: área cortical 4, parte c (motor primario)
19DI: área cortical 19, parte dorsointermedia	6DC: área cortical 6, parte dorsocaudal
19M: área cortical 19, parte medial	6DR: área cortical 6, parte dorsorostral
23a: área cortical 23a	6M: área cortical 6, parte medial (motor suplementario)
23b: área cortical 23b	6Va: área cortical 6, ventral, parte a
23c: área cortical 23c	6Vb: área cortical 6, ventral, parte b
23V: área cortical 23, parte ventral	8aD: área cortical 8a, parte dorsal
24a: área cortical 24a	8aV: área cortical 8a, parte ventral
24b: área cortical 24b	8b: área cortical 8b
24c: área cortical 24c	8C: área cortical 8, parte caudal
24d: área cortical 24d	9: área cortical 9
25: área cortical 25	ABC: complejo avidina-biotina-peroxidasa
29a-c: área cortical 29a-c	AChE: acetil colinesterasa
29d: área cortical 29d	AD: núcleo talámico anterodorsal
30: área cortical 30	ADN: ácido desoxirribonucleico
31: área cortical 31	AIP: área cortical anterior intraparietal
32: área cortical 32	ARN: ácido ribonucleico
32V: área cortical 32, parte ventral	AV: núcleo talámico anteroventral
35: área cortical 35	BDA: amino dextrano biotinilado
36: área cortical 36	BSc: Brachium del colículo superior
3a: área cortical 3a (somatosensorial)	

CB: calbindina	NGMD: núcleo geniculado medial dorsal
CE: Coeficiente de Error	NRT: núcleo reticular talámico
CeL: núcleo amigdalino central, parte lateral	OFC: corteza orbitofrontal
CeM: núcleo amigdalino central, parte medial	OPAI: Perialocorteza orbital
CL: núcleo talámico centrolateral	Opro: Proiscortex orbital
CM: núcleo talámico central medial	Opt: área cortical occipito-parietal transicional
CS: Colículo Superior	OT: núcleo del tracto óptico
CTB: coleratoxina, subunidad B	PAG: sustancia gris pericueductal
Ctt: haz córtico-tectal	PB: tampón fosfato
CyO: citocromo oxidasa	PBS: tampón fosfato salino
DAB: diaminobencimida	PC: núcleo talámico paracentral
DM: núcleo talámicosomatomedial	PEC: área cortical parietal PE, parte caudal
ECG: electrocardiograma	PF: parte rostral de la convexidad parietal inferior
EPSP: Potencial postsináptico excitatorio	PFC: corteza prefrontal
FEF: campos oculares frontales	PFG: parte rostral de la convexidad parietal inferior, caudal al área PF
FST: fundus del area temporal superior	PG: parte caudal de la convexidad parietal inferior, caudal al área PFG
GABA: ácido gamma-amino butírico	ProM: región motora proisocortical (corteza opercular precentral)
GFP: proteína fluorescente verde	PuLA: pulvinar anterior
GI: corteza insular granular	PuD: Pulvinar Dorsal
GL: núcleo geniculado lateral	PuI: pulvinar inferior
GM: núcleo geniculado medial	PuIc: pulvinar inferior central
GMD: núcleo geniculado medial, parte dorsal	PuIcM: pulvinar inferior central, parte medial
GMV: núcleo geniculado medial, parte ventral	PuIII: pulvinar inferior lateral
HRP: peroxidasa de rábano	PuIII-s: pulvinar inferior lateral, shell
IMD: núcleo talámico intermediodorsal	PuIIm: Pulvinar inferior medial
LD: núcleo talámico lateraldorsal	PuIpp: pulvinar inferior posterior
Li: núcleo talámico limitans	PuIL: pulvinar lateral
LIP: área cortical lateral intraparietal	PuILcl: pulvinar lateral central porción lateral
LIPS: sistema proyectante a capa 1	PuILd: pulvinar lateral porción dorsal
LP: núcleo talámico lateral posterior	PuILI: pulvinar lateral inferior
MIP: área cortical medial intraparietal	PuIM: pulvinar medial
MST: área cortical temporal medial superior	PuIMI: pulvinar medial parte lateral
MT: área cortical medio temporal	
MTC: área cortical medio temporal caudal	

PulMm: pulvinar medial parte medial  
 PulMm-c: pulvinar medial parte medial región central  
 PulO: pulvinar oral  
 PulV: pulvinar ventral  
 Pv: parvalbúmina  
 SEM: Error estándar de la media  
 Sg: núcleo supragenículado  
 SIP: surco intraparietal  
 SMI-32: anticuerpo monoclonal para la proteína de neurofilamento 32  
 STP: área cortical temporal superior posterior  
 STR: área cortical temporal superior rostral  
 STS: surco temporal superior  
 TAS: tampón acetato sódico  
 TC: proyección tálamo-cortical  
 TE1: área temporal TE1 (corteza inferior temporal)  
 TE2: área temporal TE2 (corteza inferior temporal)  
 TE3: área temporal TE3 (corteza inferior temporal)  
 TEO: área temporal TE, parte occipital  
 TF: área temporal TF  
 TFO: área temporal TF, parte occipital  
 TL: área temporal TL  
 TLO: área temporal TL, parte occipital  
 V1: corteza visual primaria  
 V2: área visual 2  
 V3: área visual 3 (área posterior ventrolateral)  
 V4: área visual 4 (área anterior ventrolateral)  
 VA: núcleo talámico ventral anterior  
 VAL: núcleo talámico ventral anterior, parte lateral  
 VGluT2: transportador vesicular de glutamato de tipo 2  
 VIP: área cortical intraparietal ventral

VM: núcleo talámico ventromedial  
 VP: núcleo talámico ventral posterior  
 VP3: mapa visual pulvinar 3  
 VPI: núcleo talámico ventral posterior lateral  
 VPM: núcleo talámico ventral posterior medial  
 WGA-HRP: peroxidasa de rábano- aglutinina germen de trigo



# ÍNDICE

Lista de figuras .....	IX
Lista de tablas .....	XIII
Lista de abreviaturas .....	XV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1 ORGANIZACIÓN Y CONECTIVIDAD GENERAL DEL TÁLAMO .....	3
1.1. Anatomía general del tálamo .....	3
1.2. Definición del tálamo de relevo y el tálamo asociativo .....	4
1.2.1. Origen de las clasificaciones anatómicas del sistema talamocortical. Técnicas de degeneración retrógrada y aminoácidos tritiados .....	4
1.2.2. Técnicas de marcado poblacional con trazadores retrógrados .....	8
1.2.3. Estudios poblacionales con técnicas de trazado anterógrado .....	14
1.2.4. Arquitectura de los axones talamocorticales. Marcado de célula única.....	15
1.3. Bases funcionales de la comunicación transtalámica.....	17
2 EL COMPLEJO PULVINAR .....	20
2.1. Subdivisiones del complejo pulvinar .....	21
2.1.1. Subdivisiones clásicas.....	21
2.1.2. Subdivisiones quimioarquitectónicas .....	23
2.1.3. Mapas retinotópicos .....	26
2.1.4. Relaciones entre las subdivisiones químicas y funcionales.....	26
2.1.5. Citología de las neuronas que componen el complejo pulvinar.....	28
2.2. Conectividad del complejo pulvinar .....	30
2.2.1. Conectividad subcortical del complejo pulvinar.....	30
2.2.2. Conexiones de los núcleos inferior, lateral y anterior del complejo pulvinar .....	31
2.2.3. Conexiones del núcleo pulvinar medial .....	33

2.3. Principios de la comunicación entre pulvinar y corteza .....	52
2.4. Papel funcional del complejo pulvinar en los circuitos transtalámicos .....	54
2.4.1. Papel del complejo pulvinar en las corrientes dorsal y ventral del procesamiento visual.....	54
2.4.2. Maduración del área MT. ....	55
2.4.3. Atención visual.....	56
2.4.4. Reconocimiento de serpientes. ....	57
2.4.5. Toma de decisiones espaciales. Realización de movimientos de alcance y agarre manual, y de los movimientos oculares sacádicos .....	58
2.4.6. Implicación del complejo pulvinar en la producción de lenguaje .....	60
2.4.7. Papel del complejo pulvinar en el reconocimiento de caras.....	61
II. OBJETIVOS .....	65
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	69
1. ANIMALES .....	71
1 PROTOCOLOS GENERALES DE ANESTESIA, CIRUGÍA Y PERFUSIÓN .....	71
2 EXPERIMENTOS DE INYECCIONES DE TRAZADO ANTERÓGRADO CON DEXTRANO BIOTINILADO.....	74
3 EXPERIMENTOS DE DEPÓSITOS DE TRAZADORES RETRÓGRADOS .....	75
4 CORTE Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DEL TEJIDO .....	76
4.1. Corte seriado .....	76
4.2. Experimentos de trazado anterógrado .....	77
4.3. Histoquímica para detectar la enzima acetil colinesterasa (AChE) .....	78
4.4. Tinción de Nissl.....	78
4.5. Histoquímica para detectar la enzima citocromo oxidasa .....	79
4.6. Inmunohistoquímica para el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2) .....	79
4.7. Series de visualización del marcado obtenido con trazadores retrógrados .....	81
5 ANÁLISIS DEL MATERIAL .....	81

5.1. Delimitación de las subunidades del complejo pulvinar.....	82
5.2. Análisis de los axones marcados con trazado anterógrado .....	82
5.2.1. Análisis cualitativo .....	82
5.2.2. Análisis cuantitativo .....	85
5.3. Análisis de los somas marcados retrógradamente en el complejo pulvinar.....	90
5.3.1. Análisis con el microscopio de epifluorescencia.....	90
5.3.2. Análisis de la colocalización con el microscopio confocal .....	91
IV. RESULTADOS.....	95
1 DELIMITACIÓN DEL NÚCLEO PULVINAR MEDIAL .....	96
2 EXPERIMENTOS DE TRAZADO ANTERÓGRADO POBLACIONAL.....	99
2.1. Localización de las inyecciones analizadas.....	99
2.2. Análisis cualitativo .....	100
2.2.1. Grupo de depósitos con proyecciones en cortezas parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventral. ....	102
2.2.2. Grupo de depósitos con un patrón restringido al lóbulo temporal.....	108
2.2.3. Grupo de depósitos que presentan proyecciones restringidas al lóbulo occipital.....	111
2.2.4. Depósitos que presentan un patrón cortical individual.....	116
2.3. Análisis cuantitativo de las varicosidades axónicas en áreas representativas de los lóbulos parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventrolateral .....	124
2.3.1. Estimación estereológica de la distribución laminar de las varicosidades en transectos corticales.....	124
2.3.2. Comparación del tamaño de las varicosidades entre capa 1 y capas intermedias. ....	130
3 MAPEO EN PULVINAR MEDIAL BASADO EN DEPÓSITOS DE TRAZADORES RETRÓGRADOS EN CORTEZA .....	133
3.1. Depósitos realizados en la corteza prefrontal ventrolateral.....	133
3.2. Depósitos realizados en el lóbulo parietal .....	135
3.3. Depósitos localizados en el lóbulo temporal .....	137

3.4. Resumen de la topografía dentro del pulvinar medial .....	140
4 EXPERIMENTOS DE DOBLE MARCADO .....	142
V. DISCUSIÓN .....	145
1 Consideraciones metodológicas.....	147
1.1. Consideraciones sobre las técnicas de trazado de las conexiones pulvino-corticales.....	147
1.1.1. Trazado poblacional anterógrado con microdepósitos de BDA 10KDa en PulM .....	147
1.1.2. Localización de las poblaciones neuronales dentro del PulM que inervan determinadas regiones corticales por medio de trazado retrógrado. ....	148
1.2. Análisis cuantitativo.....	149
1.2.1. Estimación del número de las varicosidades.....	149
1.2.2. Estimaciones del tamaño de las varicosidades por capa y área .....	150
2 Distribución tangencial y radial en la corteza cerebral de pequeños dominios dentro del núcleo pulvinar medial .....	150
2.1. Distribución tangencial .....	150
2.1.1. Patrón multilobular.....	150
2.1.1. Patrón restringido al lóbulo temporal.....	153
2.1.2. Patrón cortical de los axones marcados del depósito localizado en la región medial del núcleo pulvinar medial .....	153
2.1.3. Patrón restringido a cortezas occipitales .....	154
2.1.4. Depósito en el núcleo pulvinar anterior.....	155
2.1.5. Patrón del caso con un depósito en la región ventral del pulvinar medial	156
2.1.6. Límites hodológicos del PulM.....	156
3 Distribución laminar de los plexos intracorticales y de las varicosidades axonales procedentes de núcleo pulvinar medial en corteza.....	158
3.1. Análisis cualitativo de la distribución laminar de los plexos intracorticales .....	158
3.2. Distribución laminar del número de varicosidades .....	159
3.3. Implicación funcional.....	160

4	Análisis cuantitativo del tamaño de las varicosidades del núcleo pulvinar medial en corteza .....	161
5	Análisis de las poblaciones del núcleo pulvinar medial que inervan regiones de las cortezas temporal inferior, parietal posterior y frontal ventrolateral .....	163
6	Sectores hodológicos del núcleo pulvinar medial .....	164
7	Análisis de la divergencia de los axones pulvinocorticales .....	166
7	Implicación funcional .....	168
VI.	CONCLUSIONES .....	171
VII.	BIBLIOGRAFÍA .....	175

# **I. INTRODUCCIÓN**

## 1 ORGANIZACIÓN Y CONECTIVIDAD GENERAL DEL TÁLAMO

La visión del tálamo como un lugar de relevo de la entrada de información sensorial ascendente a la corteza cerebral fue definida por Luys en 1865. El patrón general de las relaciones entre tálamo y corteza fueron inferidas, originalmente, a partir de estudios basados en degeneración anterógrada y retrógrada (Jones 2012). Sin embargo, como describiremos a lo largo de este capítulo, numerosos estudios posteriores demostraron que la función del tálamo va más allá del mero relevo de la información sensorial. De forma general, la información sensorial a su paso por tálamo se transmite, modula e integra.

Recientemente, la visión del propio tálamo como una estructura de relevo ha sido modificada. Así, ya desde los núcleos tradicionales de relevo como el núcleo geniculado lateral, se produce una modulación del procesamiento de la información visual dependiendo del contexto comportamental del individuo (McAlonan et al. 2008). Además, el estudio de las aferencias subcorticales glutamatérgicas (que vehiculan la información sensorial desde la periferia) (Rovo et al. 2012) y el conocimiento cada vez más amplio de las conexiones anatómicas de los núcleos talámicos, nos ha permitido entrever que los núcleos de relevo de información subcortical, a pesar de ser los más estudiados, son una minoría en el tálamo. Se ha descrito la existencia de una amplia gama de núcleos talámicos fuera de los de relevo que presentan una dependencia cada vez mayor de las conexiones desde la corteza cerebral. Estos núcleos reciben el nombre de núcleos talámicos asociativos o “high order” (Sherman et al. 2006).

En esta línea, los núcleos talámicos asociativos establecen rutas indirectas de comunicación entre áreas corticales, que pueden influenciar de forma potente la actividad cortical (Saalmann y Kastner 2011; Purushothaman et al. 2012; Lakatos et al. 2016). Otro aspecto que refuerza la importancia del tálamo asociativo, es la constelación de déficits cognitivos que resultan de lesionar este tipo de núcleos, como es el caso de lesiones en el núcleo dorsomediano o complejo pulvinar que pueden provocar severos déficits de atención y memoria (Ward et al. 2007; Mitchell y Chakraborty 2013; Saalmann y Kastner 2013; Mitchell 2015).

### 1.1. Anatomía general del tálamo

El tálamo dorsal es un gran complejo nuclear con forma ovoide localizado en el diencefalo caudal al foramen interventricular. Lateralmente una fina banda de fibras mielinizadas, la lámina medular externa, separa el cuerpo del tálamo del núcleo reticular talámico (NRT). Una lámina curvada de sustancia blanca, la lámina medular interna, divide el tálamo en el núcleo

mediodorsal y los grupos ventrales y laterales. La parte más anterior de la lámina medular interna se bifurca y engloba otro grupo de núcleos talámicos, el grupo nuclear anterior. Caudalmente al grupo ventral se localizan los núcleos geniculado medial (GM) y lateral (GL). Dentro del grupo nuclear lateral se incluyen el lateral posterior (LP) y en su parte posterior, el complejo pulvinar que ha crecido masivamente en primates (Nieuwenhuys et al. 1998).

## 1.2. Definición del tálamo de relevo y el tálamo asociativo

### *1.2.1. Origen de las clasificaciones anatómicas del sistema talamocortical. Técnicas de degeneración retrógrada y aminoácidos tritiados*

EL primero en describir la arborización de los axones procedentes del tálamo en la corteza cerebral fue Santiago Ramón y Cajal; utilizando la técnica de Golgi observó que estos axones arborizaban profusamente en capas intermedias. Respecto a los axones que arborizaban en capa 1 fueron considerados por Cajal como parte de un sistema que no provenía del tálamo. De esta forma, en su compendio de la “Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados” (1904) sólo consideró como aferencias talámicas las que se dirigían a capas intermedias.

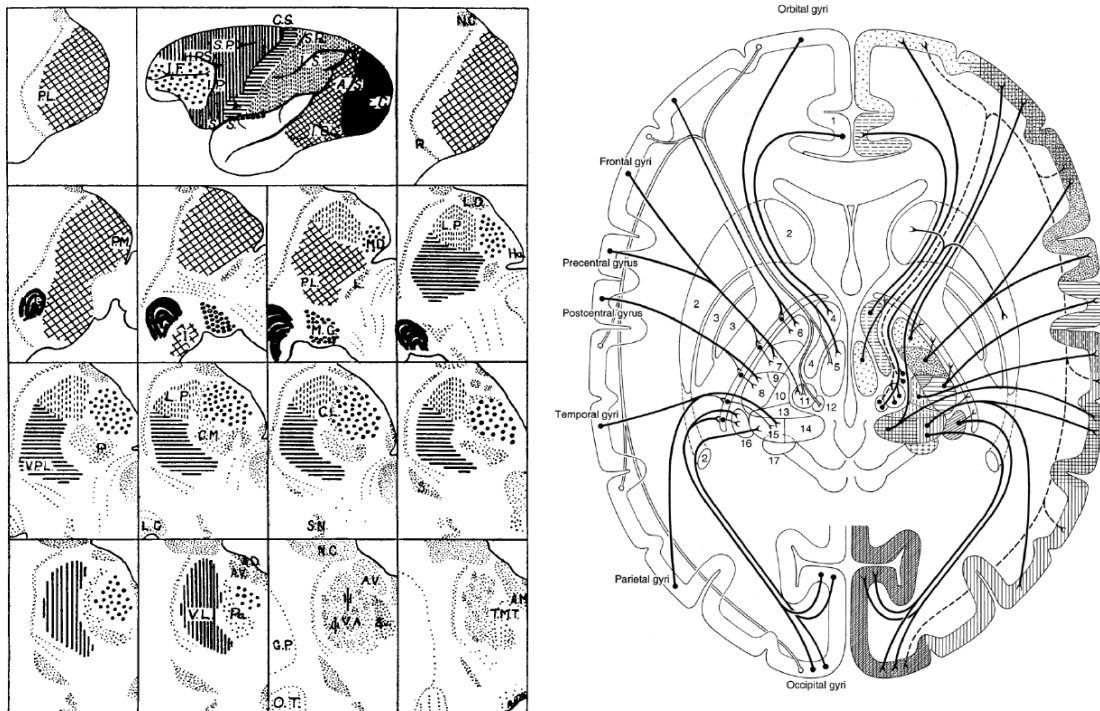
Tradicionalmente, los núcleos que componen el tálamo dorsal fueron definidos como una región citoarquitectónicamente circunscrita que recibe un conjunto particular de fibras aferentes y que proyectaban dentro de los bordes de un campo o campos corticales particulares. Esta teoría proviene de los estudios, que utilizaban la técnica de degeneración retrógrada, de Monakoc (1914), Walker (1936) y Rose and Woolsey (1949). Esta técnica consiste en la observación de los cambios estructurales que sufre el elemento proximal (soma) al lugar de transección del axón (Ravizza 1978).

En el trabajo de Walker (1936), se proponía una sistematización de la topografía global de las proyecciones talamocorticales (TC) o fibras “corticopetales” que proyectaban a cada lóbulo cerebral en macaco (**Figura 1**, izquierda). De este modo, Walker describió los núcleos talámicos que mostraban cambios degenerativos cuando se lesionaba una región cortical específica. A continuación, resumimos sus observaciones:

- El núcleo dorsomediano (DM) presentaba importante degeneración cuando se realizaban lesiones en el lóbulo frontal.
- Los núcleos ventral posterior (VP) y LP presentaban cambios degenerativos cuando se lesionaba el lóbulo parietal.
- El GM, presentaba gran cantidad de cambios degenerativos cuando se eliminaba el lóbulo temporal, en el complejo pulvinar también se describieron ligeros cambios.



- El GL se afectaba principalmente cuando se eliminaba la corteza estriada, en el caso de que la lesión involucrara a las cortezas extraestriadas se observaba también gran degeneración del complejo pulvinar



**Figura 1. Topografía tangencial de las conexiones talamocorticales en la corteza cerebral.**

**Izquierda:** Topografía cortical de los núcleos talámicos obtenida tras realizar hemi-decorticaciones de regiones específicas y observar los cambios de degeneración retrógrada en tálamo. Los núcleos en los que no se observaron cambios están representados con puntos. Tomado de Walker 1937.

**Derecha:** Esquema, relativamente moderno, de la distribución tangencial propuesta de los axones talamocorticales y cortico-talámicos que proyectan de forma topográfica en corteza. Un tipo de axones se saltan esta propiedad, de forma que dejan colaterales en estriado e inervan amplias áreas corticales y están localizados en el esquema de forma errónea en los núcleos intralaminares. Tomado de (Nieuwenhuys et al. 1998)

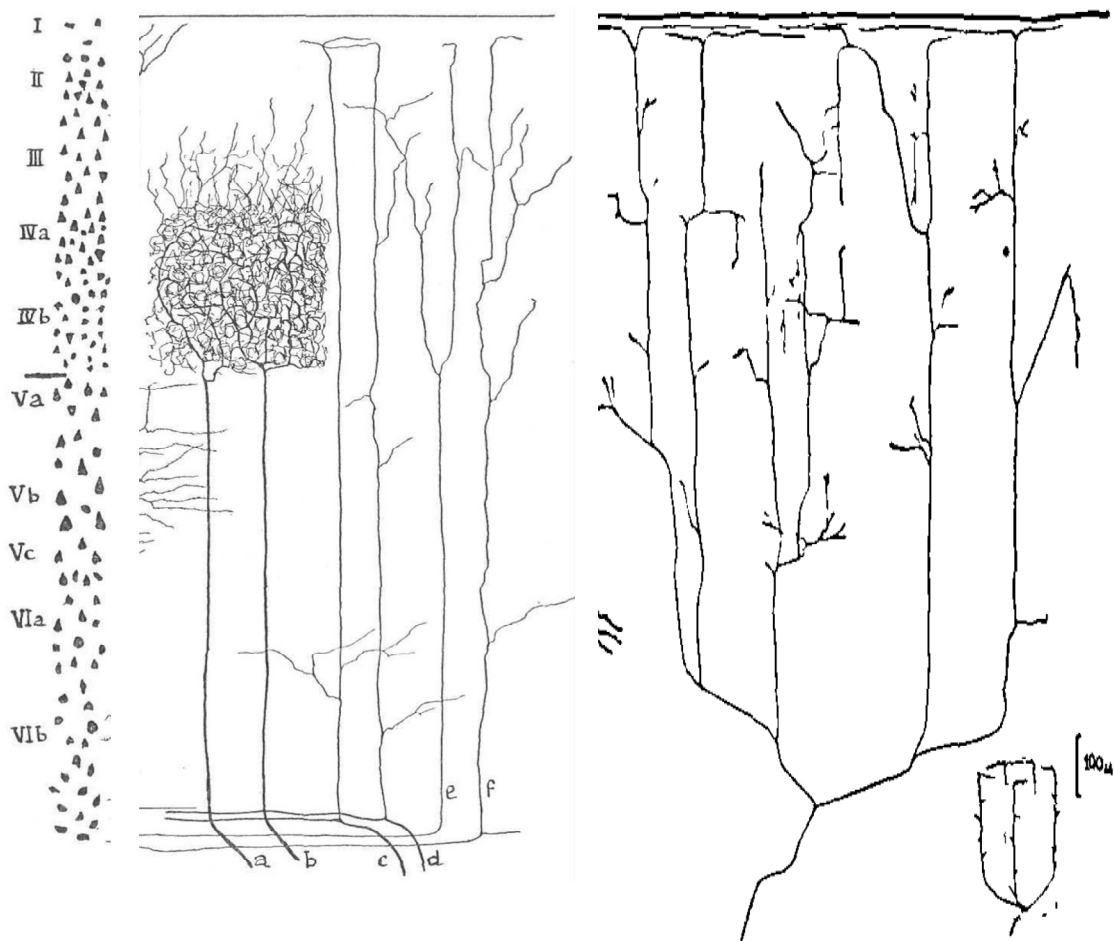
- Algunos núcleos no sufrían ningún cambio degenerativo, este fue el caso de los núcleos intralaminares y ventral anterior. Esto conllevó a que Walker asumiera que algunos núcleos talámicos no proyectaban a corteza.

Con estos datos, se consideró que ningún núcleo talámico proyectaba en regiones ampliamente separadas de corteza, de forma que, cada núcleo degenera sólo tras eliminar selectivamente su región cortical específica. Esta visión, que no es correcta del todo, se ha mantenido con algunas variaciones hasta nuestros días en muchos libros de divulgación científica, manteniendo la idea errónea de que la gran mayoría de los núcleos talámicos proyectan de forma exclusiva a regiones corticales específicas (**Figura 1**, derecha).

Avanzando en la línea de los experimentos de degeneración retrógrada, Rose y Woolsey (1949) realizaron la que sería la primera clasificación sistemática moderna de los núcleos

talámicos. Clasificaron los núcleos talámicos en extrínsecos e intrínsecos, dependiendo de si una sustancial porción de sus aferencias provenía de fuentes extra-talámicas o no, respectivamente. La teoría de los núcleos intrínsecos, que recibían aferentes de otros núcleos talámicos, no tiene evidencias actuales que la corroboren.

Por otra parte, atendiendo a criterios de la distribución laminar en corteza de las conexiones TC, Lorente de Nó en 1938 acuñó por primera vez el término de proyecciones específicas e inespecíficas en corteza de roedores. Utilizando la técnica de tinción de Golgi, demostró dos tipos de axones con distinta distribución laminar y tangencial en corteza. Las terminaciones específicas, que forman densos plexos axónicos en las capas corticales 3b y 4, y las no-específicas o multiárea que inervaban difusamente todas las capas corticales con mayor preferencia en las capas 1 y 6, presentando en ocasiones ramificaciones en sustancia blanca (**Figura 2**, izquierda).



**Figura 2. Primeras descripciones de los sistemas tálamo-corticales.**

**Izquierda:** Representación de dos tipos de proyección TC; las específicas ("a y b" y las inespecíficas ("c y d"). Los axones "e y f" no son TC sino fibras corticocorticales de asociación. Tomado de Lorente de Nó (1938)

**Derecha:** Sistema inespecífico del sistema reticular ascendente (tálamo), se precian numerosas bifurcaciones y gran extensión tangencial de este tipo de terminales talámicos. Tomado de (Scheibel y Scheibel 1968).

Scheibel y Scheibel (1958) también observaron, con la técnica de Golgi, el sistema inespecífico de Lorente de Nó. Estos autores destacaron que las fibras TC inespecíficas presentaban gran divergencia en corteza, de forma que presentaban ramificaciones antes de entrar a corteza en el nivel de la sustancia blanca cortical y dentro de corteza también ramificaban, recorriendo distancias variables horizontalmente (paralelamente a corteza) para dar un giro y continuar su ascenso a capas superiores. Cuando las ramas principales alcanzaban la parte superior de la capa 2 o la capa 1, se bifurcaban y se extendían tangencialmente en ambas direcciones justo debajo de la superficie cortical (**Figura 2**, derecha).

La dicotomía anatómica de los sistemas específicos e inespecíficos descrita por Lorente de Nó, permitía explicar los dos tipos de respuestas electrofisiológicas que se obtenían en corteza tras estimular determinados núcleos talámicos (Dempsey y Morison 1941; Morison y Dempsey 1941). De esta forma, los potenciales “en aumento” obtenidos en corteza eran explicados por la estimulación de núcleos específicos y los potenciales “reclutantes” por la estimulación de los núcleos inespecíficos (Jasper 1949, 1954). La respuesta reclutante, con activación de áreas extensas de corteza se producía al estimular cerca de los núcleos intralaminares. Esto llevó a asumir que los axones inespecíficos se originaban de los intralaminares, que proyectaban con gran extensión tangencial en la capa 1.

Sin embargo, no fue hasta que se desarrolló la técnica más sensible de trazado con aminoácidos tritiados que se pudo hacer inferencias de la topografía y el patrón laminar de los distintos núcleos talámicos. El primero en abordar el estudio sistemático de las proyecciones TC con esta técnica fue Herkenham (1980) en roedores y describió hasta cuatro categorías de núcleos talámicos en corteza dependiendo de la distribución laminar de sus terminaciones axonales:

- La primera categoría o de núcleos “específicos” incluía los núcleos sensoriales talámicos de relevo; los núcleos VP, GM y GL, cuyas proyecciones se dirigían principalmente a las capas corticales intermedias (3b y 4) y que ocasionalmente presentaban marcado en capa 1 de menor densidad que la observada en capas intermedias.
- La segunda categoría o de núcleos “intralaminares”, comprendía el patrón de terminaciones que estaban confinadas a las capas VI y V, y además presentaban proyecciones escasas y dispersas a la capa 1.

- Finalmente, las categorías 3 y 4 estaban compuestas por los núcleos “paralaminares” o “1+” que presentaban proyecciones TC que terminaban con gran densidad en capa 1 donde arborizaban ampliamente y de forma difusa. El origen de este tipo de innervación eran los núcleos ventral anterior lateral (VAL), lateral dorsal (LD), ventromedial (VM), reuniens (Re), posterior (Po), LP y magnocelular del genículo medial. Algunas de estas proyecciones se dirigían exclusivamente a capa 1 (categoría 3) donde innervaban difusamente en gran número de áreas corticales. En cambio, otras presentaban un patrón con innervación a más capas aparte de la capa 1 encontrándose en diferente combinación dependiendo del área cortical que estuvieran innervando (categoría 4).

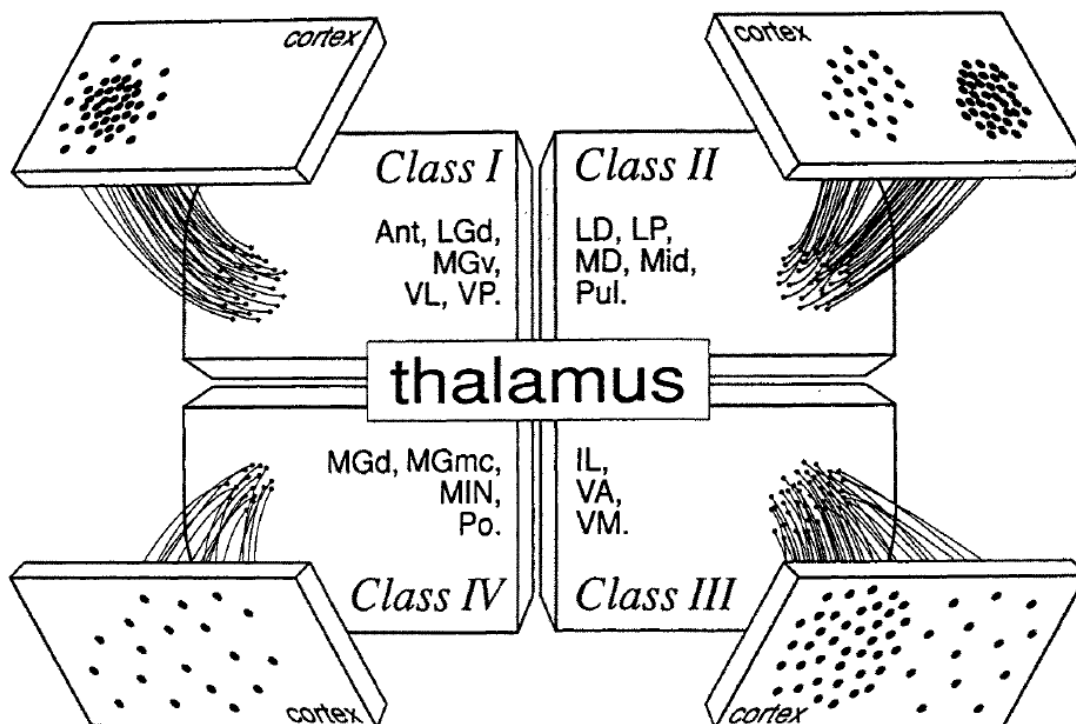
Algo que llama la atención del estudio de Herkenham (1980) es que el patrón laminar en diferentes áreas, con origen dentro del mismo núcleo, cambiaba dependiendo del área cortical que estuviera innervando. Empero, al ser inyecciones grandes que afectaban a un gran número de neuronas no se podía aclarar si este cambio de patrón se debía a que son poblaciones diferentes o si son axones que arborizaban simultáneamente, pero con patrón laminar diferente en cada área.

Otros estudios que han abordado la distribución laminar de los axones TC con aminoácidos tritiados en primate (principalmente en macaco) se han realizado en las distintas subdivisiones de los siguientes núcleos; DM (Giguere y Goldman-Rakic 1988; Ray y Price 1993; Bachevalier et al. 1997), los núcleos motores ventral anterior (VA) y lateral (VAL) (Nakano et al. 1992) y el complejo pulvinar (Benevento y Rezak 1976; Trojanowski y Jacobson 1976, 1977). Burton y Jones (1976), en su trabajo de “la región talámica posterior y sus proyecciones corticales en primates del nuevo y viejo mundo” realizaron depósitos restringidos en los siguientes núcleos: VP (lateral y medial), GM, supragenículo (Sg), Po, pulvinar medial (PulM) e inferior (PulI).

### *1.2.2. Técnicas de marcado poblacional con trazadores retrógrados*

Como apuntó Herkenham, algunas proyecciones TC presentaban mayor dispersión en corteza mientras que otras son más específicas estando restringidas a un campo cortical. Posteriormente, gracias a la acumulación de un corpus de datos experimentales con trazadores retrógrados neuronales, Macchi et al. (1996) abordó la clasificación no ya de las proyecciones sino de los núcleos talámicos que las originan. Un gran avance de esta clasificación respecto a las anteriores es el reconocimiento de que dentro del mismo núcleo talámico pueden encontrarse diferentes poblaciones celulares que pueden ser reconocidas en base a sus propiedades morfológicas, químicas, fisiológicas y de conectividad. De este modo, los atributos funcionales

de un núcleo talámico son estrictamente dependientes de las características de las poblaciones celulares que lo componen. La clasificación de Macchi realizada en gato recoge cuatro clases de núcleos talámicos (Figura 3).



**Figura 3. Clasificación de los núcleos talámicos en función del grado de dispersión o especificidad de sus proyecciones en corteza.**

En este esquema basado en trazado retrógrado, no contempla la existencia de neuronas que inervan simultáneamente a varias áreas corticales.

Tomado de Macchi et al 1996.

Los **núcleos de clase 1**, son los que originaban las proyecciones específicas descritas anteriormente que se caracterizaban por tener una importante aferencia sensorial y proyectar densamente en un campo cortical homogéneo funcional y anatómicamente. Además, desde estos núcleos se originaban proyecciones adicionales a regiones corticales adyacentes relacionadas. Los axones que pertenecían a este núcleo terminaban principalmente en capa 4 y 3b, y en ocasiones, también alcanzaban capas superficiales. Estos axones tenían su origen en distintos grupos de neuronas talámicas.

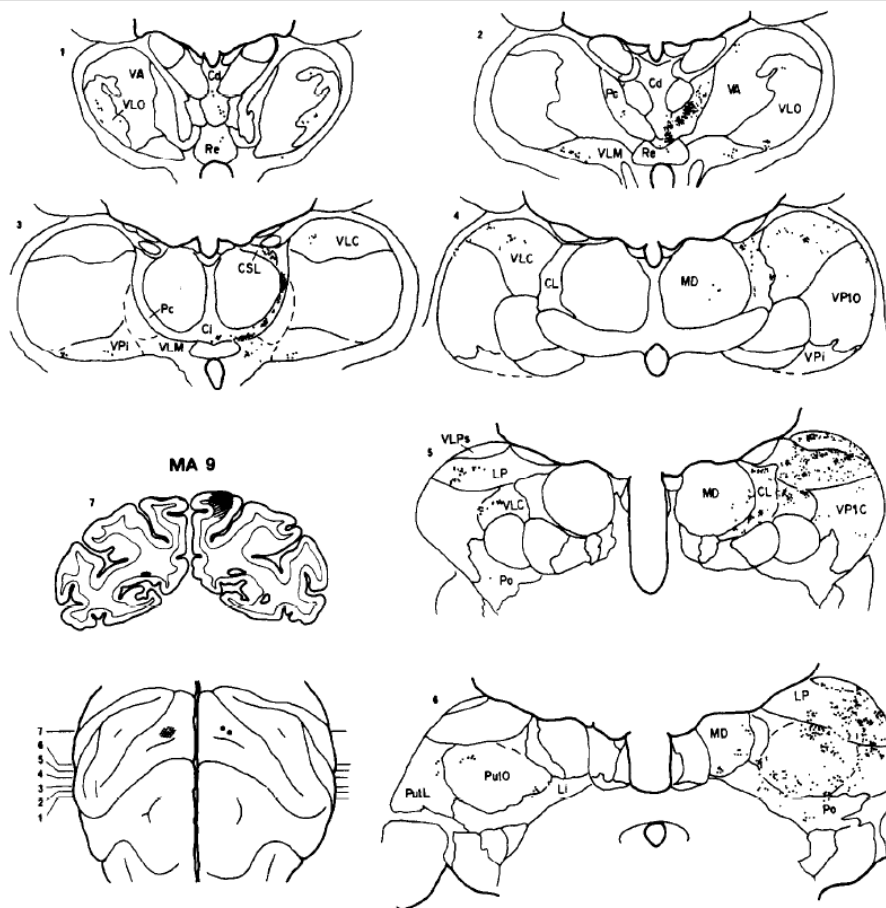
Los **núcleos de clase 2**, son núcleos cuyas poblaciones celulares recibían múltiples entradas y proyectaban de forma mixta, es decir de forma profusa en un área cortical y menos densa en un área diferente, ambas regiones corticales se encontraban relacionadas funcionalmente. En esta categoría se encuadraban los núcleos considerados como asociativos el DM, LP-Pul, LD y algunos

de la línea media (paraventricular (PV), paratenial (Pt) y el Re). La distribución laminar de las proyecciones eferentes que se originaban en este tipo de núcleo se dirigían a capa 3b y 4 así como a la capa 1 (Avendaño et al. 1990), y podían mostrar variaciones interespecíficas. Las proyecciones desde los núcleos de la línea media alcanzaban la capa 1 y capa 4 de la corteza entorrinal en la rata (Wouterlood et al. 1990).

Los **núcleos de la clase 3**, presentaban aferencias que proyectaban difusamente en corteza, de forma preferencial a un campo cortical y escasamente en los demás. En esta categoría se incluían los núcleos VA, VM e intralaminares anteriores (central-lateral (CL), paracentral (Pc) y centromediano (CM) y el centromediano parafascicular (CM-Pf)), algunos subconjuntos de estos núcleos también proyectaban a los ganglios basales. Las proyecciones aferentes desde los intralaminares anteriores, alcanzaban capas profundas en rata y tenían una terminación densa en capa 1; en gato presentaban además proyecciones en el borde entre las capas 2 y 3 (Royce et al. 1989; Molinari et al. 1994).

Por último, los **núcleos de clase 4** son los que proyectaban difusamente en más de un campo cortical. Tenían su origen en poblaciones celulares heterogéneas localizadas dentro o en proximidad a núcleos de relevo sensorial. Las dianas corticales de estas poblaciones pueden incluir áreas relacionadas con múltiples modalidades sensoriales. Algunos ejemplos de estas proyecciones se observaban en GL (capas C en gato (Boyd y Matsubara 1996; LeVay y Gilbert 1976) e interláminas en primate (Hendry y Yoshioka 1994), la división dorsal del geniculado medial y Sg (Hashikawa et al. 1995). Las subdivisiones medial, lateral e intermedia del núcleo posterior en el gato y el núcleo limitans en el mono. Estos núcleos reciben aferentes multisensoriales del tectum, retina, somatosensorial, auditivos y vestibular. Proyectan de forma escasa en áreas primarias y en áreas adyacentes.

Otra teoría, que tuvo su origen en la realización de depósitos retrógrados restringidos a capa 1 o epipiales, fue la de la existencia de dos tipos de poblaciones TC analizada por primera vez en una serie de experimentos fragmentarios en gato y primate por Avendaño et al. (1990). Compararon en el mismo animal las proyecciones TC desde capas profundas en un hemisferio y las proyecciones que se originaban exclusivamente de capa 1 en el otro hemisferio (**Figura 4**).



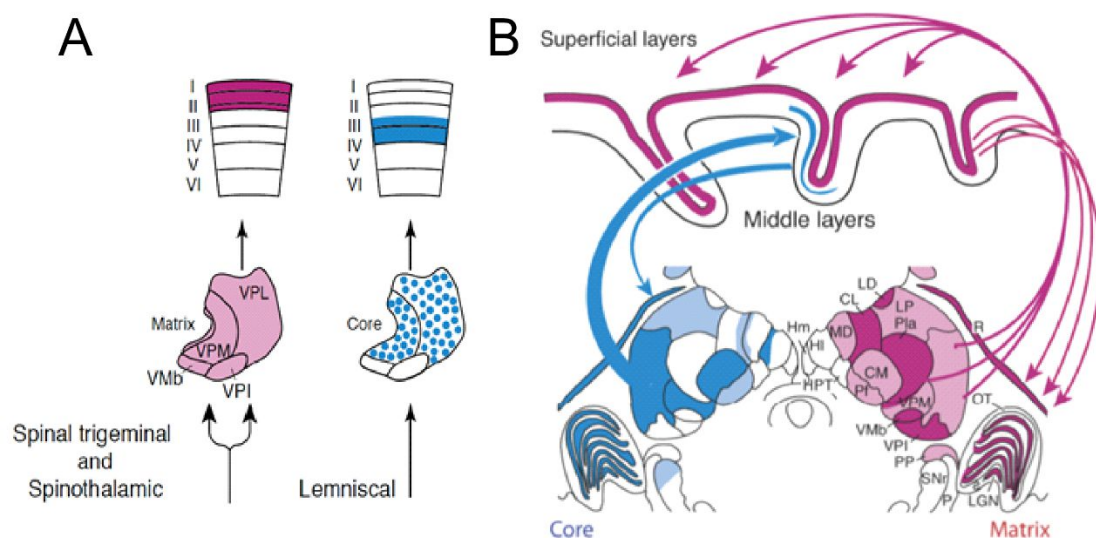
**Figura 4. Sistema talámico de proyección a capa 1.**

Comparación de la población de somas proyectantes exclusivamente a capa 1 (hemisferio izquierdo, depósito epipial), con la población que inerva varias capas corticales (hemisferio derecho, depósito en toda la profundidad cortical) en un macaco. En las secciones de tálamo se puede apreciar que la población talámico-cortical que proyecta a capa 1 se encuentra distribuida de forma diferencial en tálamo y evita los núcleos intralaminares. Tomado de Avendaño et al. 1990.

Las poblaciones TC dirigidas a capa 1 fueron definidas como parte de un sistema diferente al de capas intermedias y denominadas como el sistema proyectante a capa 1 (LIPS). Este sistema se diferenciaba a nivel de soma, siendo los somas de las neuronas que proyectan a capa 1 más pequeñas respecto a las que proyectan a capas intermedias. Además, algunos núcleos talámicos presentaban marcado retrógrado similar después de inyecciones superficiales y profundas, lo que indica que estos núcleos también proyectan a capa 1. Respecto a los intralaminares, observaron que en los depósitos corticales restringidos en capa 1 no tenían neuronas marcadas, para las áreas analizadas. De esta forma, los autores concluyeron que las neuronas del LIPS presentan una distribución en todo el tálamo (excepto en núcleos intralaminares), siendo en algunos núcleos la población principal, en otros estar entremezcladas con las que proyectan a

capas intermedias y, por último, como hemos visto en el geniculado lateral, pueden estar segregadas en subcomponentes.

Elaborando más el concepto de ambos tipos de poblaciones TC, Jones y su grupo, emplearon una característica inmunohistoquímica presente en los núcleos talámicos de macaco; la expresión diferencial de las proteínas de unión de calcio Calbindina/Parvalbúmina para derivar la teoría matriz/core respectivamente en los núcleos talámicos (revisado en Jones 1998a, 1998b; Rausell et al. 1992; Jones 2001). En esta especie, la calbindina (CB) se encuentra restringida a las neuronas que dan lugar al sistema tipo matriz o inespecífico, que proyecta a capa 1, y se encuentra distribuido a lo largo del tálamo sin estar limitado por los bordes nucleares. En contra, la parvalbúmina (Pv) se expresa en los sistemas específicos o core, que se encuentran superpuestos al sistema de tipo Matriz estando restringidos dentro de los límites de determinados núcleos como son los motores y sensoriales de relevo. En el resto de núcleos talámicos, que no son “core”, las neuronas que conforman la matriz presentan mayor desarrollo de forma que hay más somas de tipo matriz en núcleos exclusivos a esta población **Figura 5**.



**Figura 5. Teoría de la organización de las proyecciones talámicas en sistemas tipo matriz (rosa) o “core” (color azul).**

**A:** Ambos sistemas reciben diferentes tipos de aferencias subcorticales y sus axones arborizan en capas corticales diferentes.

**B:** La distribución de ambos tipos de poblaciones es diferente en tálamo y presentan distinto grado de dispersión cortical

Tomado de Jones 2007

Otra característica diferencial de ambos sistemas son sus proyecciones de entrada y salida. El sistema “core” recibe aferencias subcorticales organizadas topográficamente con terminaciones axonales confinadas dentro de los límites de su núcleo específico de modalidad (Lemnisco



medial, tracto óptico. Etc.), dentro del núcleo las células “core” presentan campos receptivos muy definidos con un acoplamiento estímulo-respuesta fuerte, de forma que proyectan con el mismo grado de topografía a uno o pocos campos corticales limitados a los límites arquitectónicos y funcionales de estos. En cambio, el sistema matriz recibe aferencias subcorticales difusas, cuya distribución no está limitada a un único núcleo talámico (por ejemplo, el tracto del sistema anterolateral), las neuronas que reciben estas proyecciones ya no presentan un campo receptivo bien definido y proyectan en la corteza cerebral a más de un área cortical sin estar restringido a límites arquitectónicos o funcionales.

La mayoría de los núcleos talámicos a pesar de estar dominados por alguno de los dos tipos presenta mezcla de ambas poblaciones lo que nos podría indicar la existencia de dos vías paralelas de transmisión de la información con distintas características funcionales y de conectividad. Estas vías, están completamente segregadas en algunos núcleos talámicos del macaco como son el VP (Rausell y Jones 1991a, 1991b; Rausell et al. 1992), GM (Hashikawa et al. 1991, 1995a) y GL (Jones y Hendry 1989; Hendry y Yoshioka 1994).

En otras especies no primates, principalmente gatos y roedores, se ha examinado si sus poblaciones TC también presentan una organización tipo matriz/core. Sin embargo, la aplicación directa de esta teoría únicamente por medio de técnicas inmunohistoquímicas no es posible debido a que en estas especies no se observa una delineación específica de estas poblaciones en función de la expresión de proteínas de unión de calcio. En gatos no se cumple la relación observada en macacos, siendo las neuronas TC positivas para CB pero negativas para PV, esta proteína pasa a expresarse en el sistema GABA-érgico intrínseco talámico (Batini et al. 1991; Demeulemeester et al. 1991; Molinari et al. 1994). En roedores también ha sido ampliamente estudiado, concretamente, trabajos de nuestro laboratorio, demostraron en la rata que una gran población de neuronas TC que proyectaban a capa 1 (con excepción de los núcleos CM e interanteriomédial que si la expresaban) no expresaban selectivamente calbindina (Rubio-Garrido et al. 2007). Sin embargo, el hecho de que no se cumpla la expresión diferencial de CB/PV no excluye que la organización Matriz/Core sea también aplicable en estas especies.

En otros trabajos también con técnicas de marcado retrógrado, se ha descrito en gatos la existencia de dos tipos de poblaciones (Avendaño et al. 1990) y en ratas, un trabajo posterior de nuestro laboratorio complementó el estudio del sistema proyectante a capa 1 en mayor número de áreas corticales (Rubio-Garrido et al. 2009). En las que se apreció que estas proyecciones inervan la corteza cerebral de manera altamente convergente (un núcleo hacia varias áreas corticales) y divergente (una misma área cortical recibe aferencias de varios núcleos). Además,

se observó que las neuronas TC que proyectan a capa 1 son muy numerosas y se localizaban en muchos núcleos talámicos, especialmente en VM, VA, LP y Po. La población que proyecta de forma específica a capas intermedias (core) también ha sido descrita ampliamente (revisado en Jones 2007)

### *1.2.3. Estudios poblacionales con técnicas de trazado anterógrado*

La llegada de trazadores anterógrados con resolución axonal, como los dextranos biotinilados o fluorescentes y Phaseolus vulgaris (Pha-L) o el trazador bidireccional WGA-HRP, ha permitido atisbar la arquitectura o fenotipos tanto dendríticos como axonales de las neuronas TC. Además, la posibilidad de obtener inyecciones cada vez más pequeñas y restringidas de estos trazadores en diferentes localizaciones del mismo núcleo permitió afinar las observaciones previas, de modo que las proyecciones difusas de determinados núcleos parecían ser menos extensas y presentaban algún tipo de topografía cortical (Rubio-Garrido et al. 2009). En rata, se han realizado gran número de estudios poblacionales de las neuronas TC con trazadores anterógrados; en los núcleos anteriores (Shibata 1993, Van groen et al. 1999), en lateral dorsal (Van Groen y Wyss 1992), posterior (Ohno et al. 2012, tesis doctoral César Porrero 2016), Ventral posterior (Lu y Lin 1993), núcleos de la línea media e intralaminaes (Wouterlood et al. 1990).

En primate, los estudios poblacionales con trazadores anterógrados han sido más fragmentarios, y generalmente con inyecciones de gran tamaño. Aún así, son estudios valiosos ya que permiten atisbar toda la conectividad aferente de una región talámica concreta, de forma que se han podido explorar las aferencias talámicas de regiones corticales con abordaje quirúrgico complicado para realizar depósitos retrógrados. Es el caso de la corteza parahipocampal cuyos aferentes talámicos sólo se conocen gracias al trazado anterógrado desde tálamo (Baleydier y Mauguier 1985a).

A continuación, mencionamos los trabajos con depósitos anterógrados en distintos núcleos talámicos de primates y prosimios. Con Pha-L se han realizado estudios en macaco en los núcleos CM, parafascicular (PaF) y GM (Sadikot et al. 1990, 1992; Hashikawa et al. 1995b). En estudios más modernos se han realizado depósitos de BDA en macaco en los núcleos dorsales de línea media, paratenial (Pt) y PaF (Hsu y Price 2007), en DM, VA y VAM con dextranos fluorescentes (Zikopoulos y Barbas 2007a), en PulL de prosimios (Marion et al. 2013) y de macaco (Imura y Rockland 2007). Con la subunidad B de la coleratoxina (CTB) en VPL y VPM (Craig 2014) y por último utilizando el trazador bidireccional WGA-HRP se han realizado trabajos en PulM de macaco (Romanski et al. 1997), GM (Pandya y Rosene 1993) de macaco y en GL de la tupaya arborícola (Conley y Friederich-Ecsy 1993).

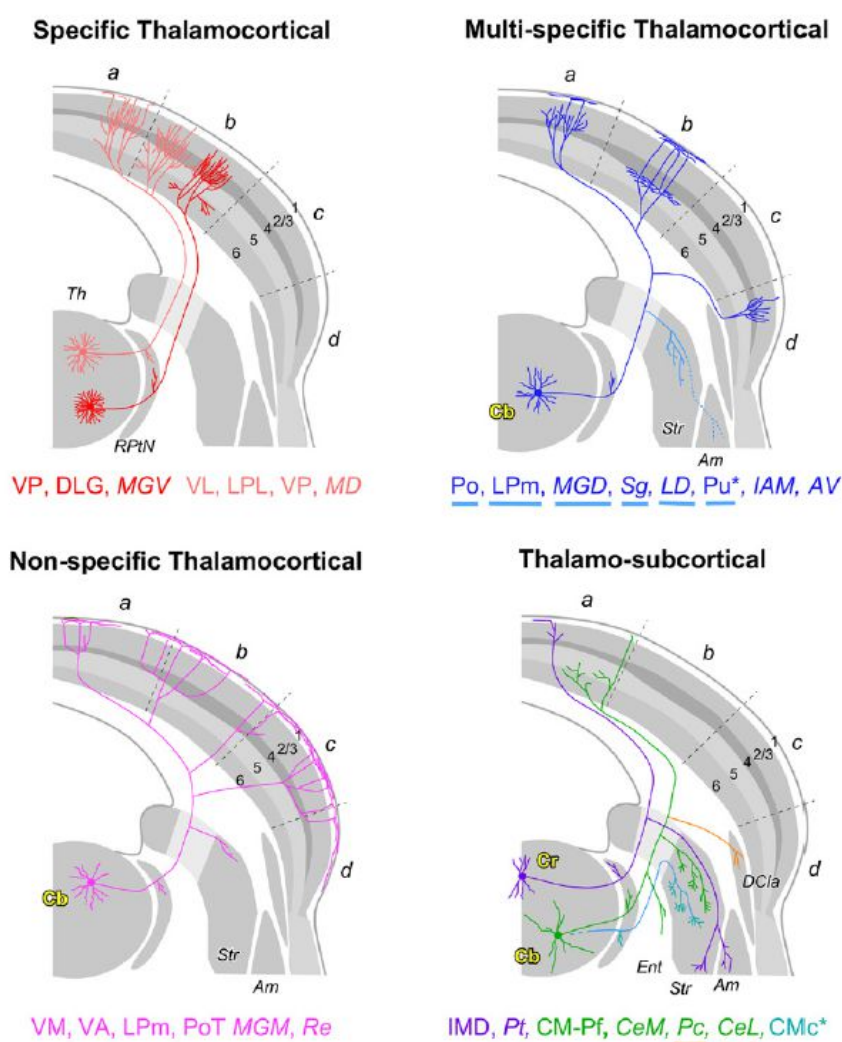
#### *1.2.4. Arquitectura de los axones talamocorticales. Marcado de célula única.*

La complejidad de la arquitectura de las conexiones TC ha impuesto que en los últimos años se desarrollen técnicas novedosas que permitan marcar una o pocas células TC. La primera técnica que se llevó a cabo fue realizar el relleno del árbol axónico inyectando HRP en sustancia blanca para marcarlo a su paso, esta técnica fue realizada en gato en la radiación óptica con lo que consiguieron marcar los arboles axónicos en cortezas estriadas y extraestriadas (Ferster y Levy 1978; Freund et al. 1985) y en rata en corteza somatosensorial (Jensen y Killackey 1987). Otra técnica, fue realizar depósitos poblacionales en tálamo y en corteza buscar axones en regiones con marcado anterógrado no muy denso que pudieran seguirse a lo largo de varios cortes para realizar su reconstrucción en cámara clara o neurolucida. Esto se ha realizado en pulvinar de macaco con BDA (Rockland et al. 1999), en el núcleo ventral anterior de rata (Odagiri et al. 2011) y en el núcleo ventrolateral de gato (Shinoda y Kakei 1989). Sin embargo, estas técnicas estaban limitadas a reconstrucciones parciales de axones distales no modo que se pierde una parte importante de la arquitectura de los axones TC.

El marcado del soma, dendritas y axones de neuronas de proyección se realizó al principio con técnicas de relleno intracelular, con iontoforesis juxtacelular de dextranos o biocitina. Este método fue desarrollado por Pinault (1996) y consiste en una pipeta de vidrio rellena del trazador en una solución salada con la que se realiza simultáneamente el registro juxtacelular y la iontoforesis del trazador con pulsos de intensidad muy baja ( $<10\text{nA}$ ). La iontoforesis se produce mientras se esté llevando a cabo el registro en buenas condiciones. Los trabajos con esta técnica han sido realizados en ratas (Nosedá et al. 2011; Deschênes et al. 1996; Oberlaender et al. 2012), a excepción de Parent y Parent (2005) que la aplicaron en el núcleo parafascicular y centromediano de macaco. Esta técnica no ha tenido gran difusión debido a dos factores principales; su dificultad técnica y que no se pueden llegar a rellenar del todo la compleja arquitectura de las neuronas TC más complicadas. El marcado completo de toda la neuronas se ha conseguido, en roedores, con el desarrollo de vectores virales que secuestran la maquinaria genética de la célula para que produzcan únicamente el producto reportero (GFP) estas proteínas suelen tener una secuencia que permita direccionarlos a los axones para permitir y asegurar un relleno completo, sin importar la complejidad de sus ramas (Chamberlin et al. 1998; Kuramoto et al. 2009, 2015; Ohno et al. 2012; Nakamura et al. 2015). Ampliando en el uso de vectores virales, en nuestro laboratorio se llevó a cabo la puesta a punto de otra técnica, altamente eficiente y simple para el marcado de neuronas de proyección en una localización específica, con suficiente definición para permitir reconstrucciones del árbol axonal. Este método está basado

en la transfección in vivo con un constructo de ARN (Pal-eGFP-sindbis RNA) denominada electroporación (Porrero et al. 2016; tesis doctoral Cesar Porrero).

Basándose en las neuronas únicas obtenidas con las técnicas nombradas anteriormente, y en las técnicas de trazado anterógrado poblacional, nuestro grupo realizó un revisión de los distintos fenotipos de neuronas TC presentes en el tálamo (Clascá et al. 2012, 2016). Se clasificaron los fenotipos predominantes en cada núcleo talámico observándose hasta cuatro categorías diferentes (**Figura 6**).



**Figura 6. Representaciones esquemáticas de los fenotipos de neuronas tálamo-corticales descritos actualmente.**

Aquellos núcleos talámicos en los que no se ha encontrado evidencia directa basada en estudios de neurona única aparecen en letra cursiva ya que requieren de posterior confirmación. Podemos apreciar que las proyecciones tipo específico tálamo-cortical es el mismo que los núcleos de relevo. Las proyecciones multi-específicas presentan neuronas que ramifican sus axones e inervan distintas áreas corticales, en ocasiones con patrón laminar diferente. Las proyecciones no-específicas, son las que proyectan de forma profusa en capa 1 con una gran dispersión tangencial. Por último, los axones tálamo subcorticales son los que no presentan o presentan mínima inervación en corteza siendo su diana principal alguna estructura subcortical como los ganglios basales o amígdala.

Tomado de Clascá et al. 2016

- **Neuronas de tipo específico:** están caracterizadas por presentar plexos de arborizaciones en capas intermedias de corteza formando un único foco cuando la topografía es estricta, o dos focos en regiones acopladas funcionalmente; los núcleos talámicos que presentan este fenotipo son VP, DLG, MGV y del segundo VL, LPL, VP y MD.
- **Neuronas no específicas:** se caracterizan por inervar de forma difusa la capa 1 de gran número de áreas corticales; se puede apreciar inervación muy débil en las otras capas y ocasional inervación de estriado; son características de los núcleos VM, VA, LPm, PoT, MGM y Re.
- **Neuronas de tipo multi-específico:** se caracterizan por inervar con distintos patrones laminares en varias áreas corticales; sin embargo, esta inervación no es difusa si no que consiste en parches discretos de marcado en cada área; en algunos núcleos se aprecia inervación del estriado, este tipo de inervación se está estudiando ahora mismo y se observa en núcleos asociativos como son el Po, LPm, MGD, Sg, LD, Pu, IAM, AV.
- **Neuronas de tipo subcortical:** son neuronas talámicas de proyección a estructuras subcorticales; amígdala y estriado. Pueden presentar escasa inervación en regiones sensoriales y motoras en sus capas profundas. Son los núcleos intralaminares y de la línea media; IMD, Ot, CM-Pf, CeM, Pc, CeL y CMc.

### 1.3. Bases funcionales de la comunicación transtalámica

En la visión clásica de la comunicación corticocortical, el tálamo no era considerado un componente importante, esta se limitaba a las vías córtico-corticales directas que conectaban directamente áreas corticales entre sí. Además, las vías glutamatérgicas de este sistema eran consideradas uniformes funcionalmente (Sherman et al. 2006). En sintonía con lo anterior, datos neurofisiológicos y anatómicos, llevaron a concebir las conexiones corticocorticales como un sistema jerárquico, de forma que el flujo de información seguía el sentido desde áreas sensoriales primarias hacia áreas asociativas. De esta forma, las diferentes cortezas se comunicaban entre sí con proyecciones *feedforward* (siguiendo el flujo jerárquico de organización cortical) o *feedback* (con dirección contraria a la jerarquía) (Felleman y Van Essen 1991).

Sin embargo esta visión presentaba una serie de incongruencias, por una parte diversos estudios demostraron que hay distintas clases de vías glutamatérgicas, tanto córtico-corticales como TC y corticotálámicas (CT), que varían sustancialmente en sus propiedades (Reichova y Sherman 2004; Lee y Sherman 2008; Covic y Sherman 2011; Víaene et al. 2011a). Y por otra,

quedó en evidencia la existencia de una vía paralela a la vía directa corticocortical: la vía indirecta transtalámica. En esta vía, el tálamo actúa como una estación de relevo intermedio entre la comunicación de dos áreas corticales (Sherman y Guillery 2011; Sherman 2017).

La teoría de la división funcional de las vías glutamatérgicas en “driver” o moduladoras nació de las observaciones de Sherman y Guillery (1998), y ha sido ampliamente elaborada en trabajos posteriores (Sherman y Guillery (2002,2006,2007,2013)). Las principales características de estos tipos de vías están recogidas en la **Tabla 1**. Una característica funcional importante es que los terminales “driver” producen potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) grandes, que expresan inhibición por pares de pulsos, indicativos de una elevada probabilidad y fiabilidad de transmisión de la información, mientras que los moduladores producen EPSPs más pequeños que muestran facilitación por pares de pulso, indicando una baja probabilidad de liberación (Dobrunz y Stevens 1997).

Terminales “driver” (Clase 1)	Terminales moduladores (Clase 2)
Axones gruesos	Axones finos
Contactan en dendritas proximales	Contactan en dendritas distales
Terminales grandes	Terminales pequeños
EPSPs grandes	EPSPs pequeños
Las sinapsis muestran inhibición por pares de pulsos	Las sinapsis muestran facilitación por pares de pulsos
Activación de receptores ionotrópicos	Activan receptores metabotrópicos
Árboles terminales densos	Árboles terminales divergentes

**Tabla 1. Propiedades de las vías “driver” (clase 1) y moduladoras (clase 2). EPSPs (potenciales postsinápticos excitatorios).**

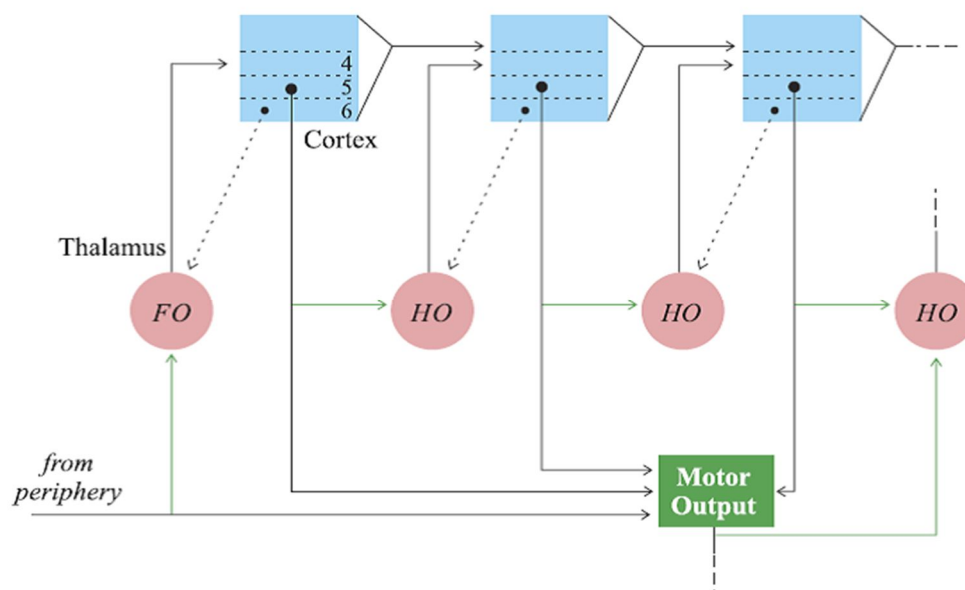
Tomado de Sherman y Guillery (2011)

Los términos “driver” y modulador, que fueron descritos en las vías CT, han sido renombrados, en los últimos trabajos de Sherman y Guillery, como vías de clase 1 y clase 2 respectivamente (Sherman y Guillery 1996, 2011; Guillery y Sherman 2002; Sherman 2012). Respecto al papel “driver” y modulador que puedan ejercer las vías talámicas en corteza no hay consenso. Según Sherman las vías TC “driver” se dirigen principalmente a la capa 4 de corteza (Lee y Sherman 2008). En el caso de las otras capas observaron que algunas aferencias a las capas 1/2 tienen propiedades similares a las proyecciones “driver” y el resto, que son la gran mayoría, tienen características de tipo modulador (Viaene et al. 2011a, 2011b). Finalmente las conexiones tipo “driver”, a pesar de ser 5 a 10 veces menores en cantidad que las moduladoras, son funcionalmente dominantes (Guillery y Sherman 2002). Por eso, evaluar la capacidad de las

proyecciones para influenciar la actividad de las células postsinápticas basándose únicamente en números anatómicos puede ser erróneo (Van Horn y Sherman 2007; Rovo et al. 2012).

Los núcleos talámicos pueden ser clasificados en núcleos de relevo o asociativos en función del origen de su proyección directriz. En la **Figura 7**, se recoge el circuito ideado por Sherman y Guillery (2011). Los núcleos talámicos de primer orden, cuyas aferencias “driver” tienen origen subcortical y proyectan a cortezas sensoriales primarias con una transmisión topográfica exacta. En cambio, los núcleos “high order” o asociativos, reciben aferencias “driver” con origen en la capa 5 de áreas corticales, que se encuentran un paso por detrás en el orden jerárquico (*feedforward*). Las aferencias “driver” corticales son funcionalmente similares a los terminales de aferentes subcorticales.

Ambos tipos de núcleos talámicos reciben aferencias corticales glutamatérgicas con origen en la capa 6. Estas aferencias no llevan la información principal, sino que modulan la transmisión de la información en tálamo, por lo que se denominaron vías moduladoras. El sentido de esta información moduladora es “feedback”, es decir, son aferencias que provienen de áreas corticales en una posición posterior en el flujo de procesamiento de la información (Sherman y Guillery 2011).



**Figura 7. Vías transtálamicas corticocorticales y vías corticocorticales directas.**

La información procedente de la periferia alcanza los núcleos de relevo sensorial directo y de allí la información es enviada a corteza por medio de las vías de clase 1. La corteza cerebral a su vez envía dos tipos de conexiones a tálamo, una conexión será desde neuronas con origen en capa VI hacia el núcleo talámico que le está aportando su conexión “driver”, *feedback*, por medio de vías de clase 2 y por otra parte la corteza envía la aferencia “driver” a núcleos talámicos asociativos desde neuronas que se encuentran en capa V. De esta forma el flujo de la información “driver” se dirige en favor de la jerarquía siendo por tanto *feedforward* y la información moduladora es *feedback*. (Sherman y Guillery 2011)

Pese a todo, el conocimiento del funcionamiento de los núcleos asociativos es limitado. Históricamente, los núcleos sensoriales primarios o de relevo han sido los más estudiados y se generalizaron los conceptos originados tras su estudio a todos los núcleos talámicos. Aunque estudios posteriores dejan en entredicho esta premisa para los núcleos asociativos (Kultas-Ilinsky et al. 2003).

## 1 EL COMPLEJO PULVINAR

La primera descripción que se realizó del pulvinar fue la del anatomista francés Vicq d'Azyr en 1786, en disecciones de cerebros humanos fijados con alcohol. Este anatomista definió al pulvinar como el tubérculo talámico posterior. Medio siglo después, Burdach en 1822, utilizando la misma técnica, profundizó en la descripción de los núcleos talámicos y denominó a la protrusión posterior del tálamo como pulvinar, debido a su semejanza con un par de almohadones o cojines, cuya traducción en latín es “pulvinus” (Foley 2015).

En su “Tesis de los cuatro centros”, Luys (1865) consideraba que el pulvinar formaba parte del centro posterior, sin embargo, le asignó erróneamente una función auditiva debido a la aparición de degeneración de fibras en dos casos de pacientes sordomudos (Jones 2007). Fue Dejerine (1901), en su compendio de la Anatomía del Sistema Nervioso del Humano (Dejerine y Dejerine-Klumpe 1901) el primero en referirse al pulvinar como un cuarto núcleo talámico.

El complejo pulvinar, localizado en la región posterior del tálamo posterior, es una de las regiones que más ha contribuido al aumento del volumen talámico en la evolución de primates (Isbell 2009). Este núcleo, que no es reconocible en roedores y otros mamíferos pequeños, llega a ocupar un cuarto de la masa talámica total en primates, y alcanzando su mayor expansión en el cerebro humano. El aumento del volumen, en paralelo a la expansión de las áreas asociativas en el cerebro de primates, podría estar correlacionado con la evolución de las funciones superiores del cerebro (Stepniewska 2003). Se ha sugerido que su desarrollo progresivo está asociado con la presión de la selección natural que involucra la coordinación de actividades espaciales relacionadas con la habilidad manual, habilidades de mapeado visuoespacial, actividad orientada a objetivos, abstracción visual y atención (Mai y Paxinos 2011).

Sin embargo, el conocimiento de este interesante complejo talámico es muy fragmentario. Por una parte, se han descrito hasta doce subdivisiones del núcleo, con un patrón conectómico muy complejo que abarca grandes regiones corticales muy diversas, desde cortezas primarias sensoriales hasta áreas polimodales de asociación. Sin embargo, como algunas de sus



subdivisiones no tienen una aferencia sensorial organizada reconocible electrofisiológicamente, el estudio se ha centrado preferentemente en la región ventral del complejo donde existen campos retinotópicos bien definidos (Grieve et al. 2000).

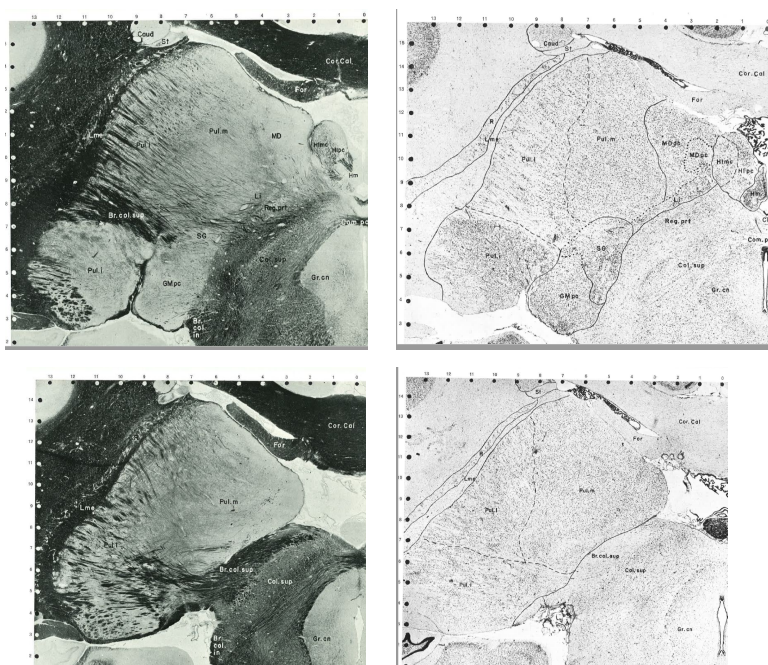
### 1.1. Subdivisiones del complejo pulvinar

Anatómicamente, el complejo pulvinar forma parte del tálamo dorsal. Se encuentra posterior, medial y dorsal al GL y cubre el colículo superior (CS). El haz de fibras del *brachium* del colículo superior (bsc) se localiza en niveles rostrales en una relación ventral a los componentes del Pull y en niveles caudales el BSc progresa dorsalmente para entrar en el CS contralateral, estableciendo el límite medial entre el complejo pulvinar y el pretecho. Otro haz de fibras, el haz corticotectal (“corticotectal tract” o ctt), atraviesa horizontalmente al complejo pulvinar, permitiendo una división de este en una parte dorsal al ctt y otra ventral al ctt (Grieve et al. 2000). Numerosos autores han considerado de forma sistemática el ctt como parte del BSc, sin embargo, al ser haces de fibras con un origen completamente diferente, hemos decidido en nuestras delimitaciones mantener ambos tractos separados.

#### 1.1.1. Subdivisiones clásicas

El análisis de la mieloarquitectura del tálamo de primates, del género *Cercopithecus*, realizado por Vogt (1909), distinguió una parte lateral y medial del pulvinar, la primera dividida en cinco regiones y la medial en cuatro. Las divisiones de Vogt fueron reconocidas también en cercopiteco, mediante tinciones de Nissl (Friedemann 1911), y en lémures mediante tinciones de Nissl y mielina (por Pines 1927). La primera división que se realizó en mono rhesus (*Macaca mulatta*), siguió criterios mieloarquitectónicos (Crouch 1934) y en chimpancé se realizó con análisis de degeneración retrógrada en animales hemi-decorticados (Walker 1938). En el trabajo de Crouch, en base al tamaño, las cualidades de tinción y el ordenamiento de los somas, se llegaron a reconocer hasta cuatro subdivisiones dentro del pulvinar medial: superior, intermedia, inferior y medial.

Basándose en estos trabajos previos y con un abordaje mielo y citoarquitectónico Olszewski publicó un atlas en macaco que se convirtió en la referencia estándar en los trabajos anatómicos posteriores (Olszewski 1952). Definió cuatro subdivisiones en el complejo pulvinar: los núcleos pulvinar medial (PulM), pulvinar lateral (PulL), pulvinar inferior (PulI) y el pulvinar oral (PulO). El complejo pulvinar fue descrito en la tinción de Nissl por estar compuesto por células teñidas ligeramente, de tamaño medio y multipolares. Las subdivisiones PulL y PulM fueron localizadas dorsalmente estando separadas del PulI por los haces de fibras que forman el ctt. PulM se caracteriza por la distribución homogénea de sus células; en PulL sus grupos de somas están atravesados por los haces de axones del ctt, dando un aspecto bandeado respecto a PulM. La división oral (denominada anterior en clasificaciones posteriores) se encuentra en la porción más rostral del complejo y sus células presentan una agrupación laxa e irregular (**Figura 8**).



**Figura 8. Secciones coroneales del complejo pulvinar de macaco tomadas del atlas de Olszewski (1952).**

En cada fila se muestran niveles adyacentes de un nivel anterior (fila superior) y posterior fila (inferior) del pulvinar de macaco. En la columna de la izquierda se muestran secciones teñidas para la mielina, y en la derecha para la tinción de Nissl con los bordes de las subdivisiones dibujadas.

Las cuatro subdivisiones mencionadas anteriormente, pueden ser reconocidas en la mayoría de los primates. Sin embargo, son menos obvias o no se presenta alguna en prosimios (Jones 2007). En estos, el pulvinar está dividido en dos regiones, una superior o dorsal y otra inferior o ventral, con el haz ctt actuando como el límite entre ambas (Allman et al. 1972, Raczkowski and Diamond 1980).

### 1.1.2. Subdivisiones quimioarquitectónicas

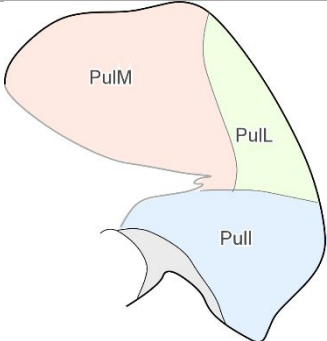
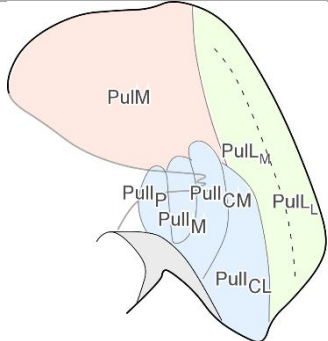
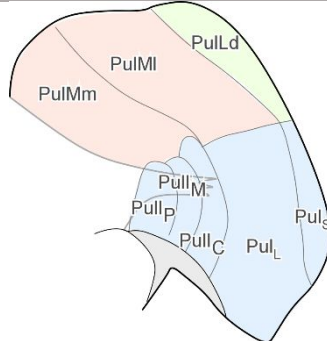
Desde su publicación, las subdivisiones de Olszewski se han refinado gracias al desarrollo de técnicas histoquímicas: como las técnicas de citocromo oxidasa (CyO) y acetilcolinesterasa (AChE); y también gracias al uso de técnicas inmuohistoquímicas frente a calbindina (Cb), parvalbumina (Pv) y neurofilamentos (SMI-32).

La región ventral del complejo pulvinar, es la que ha adquirido mayor número de subdivisiones en trabajos posteriores en los que se observa disparidad en los modelos de subdivisiones del pulvinar propuestos. De forma que podemos hablar de dos clasificaciones diferentes en función de criterios quimioarquitectónicos. Una clasificación es la propuesta por el grupo de Jonh Kaas, en su primer trabajo (Lin y Kaas 1979) para el mono aullador y revisado en Stepniewska y Kaas (1997) para los componentes del pulvinar inferior en primates del viejo y nuevo mundo. Otra clasificación es la elaborada por el grupo de Catherine Cusick, revisada en macaco para los componentes inferior en Gutierrez et al. (1995) y dorsal del pulvinar en Gutierrez et al. (2000); en los trabajos de Gray et al. (1999) y Cola et al. (2005) se realizaron estas subdivisiones para el pulvinar inferior de mono ardilla y chimpancé respectivamente.

PuLA y las subdivisiones (posterior, media y central) del Pull presentan la misma delimitación en ambos modelos. Sin embargo, PulM sufre varias subdivisiones en el modelo de Gutierrez et al. 2000 (que serán descritas con detalle en el apartado correspondiente) que no son consideradas en el esquema de Kaas. PulL y la región lateral del Pull son las que presentan mayores diferencias en ambos modelos. El modelo de Kaas es el que se acerca más a la división clásica, manteniendo la extensión dorsoventral del PulL descrita por Olszewski, diferenciando (Stepniewska y Kaas, 1997) una parte medial (PulLm) y otra lateral (PulLI) en función de diferencias en la inmuohistoquímica para el anticuerpo Cat-301 (anticuerpo contra el proteoglicano anticondroitin sulfato). En el modelo de Gutierrez, el PulL queda reducido a una estrecha banda en el aspecto más lateral de la región dorsal del complejo pulvinar, caracterizada por la elevada tinción en la AcE y ventralmente, aparece una nueva subdivisión del Pull, la subdivisión lateral (PullL). En la **Tabla 2**, recogemos las principales subdivisiones del complejo pulvinar propuestas por estos grupos en macaco.

De forma general, es importante mencionar que todos los autores refuerzan la idea de que algunas subdivisiones del Pull cruzan el límite del ctt ocupando una región dorsal a este. A continuación, reseñamos los trabajos y las especies en los que se han analizado las subdivisiones del complejo pulvinar. Macaco: *Macaca mulatta* (Cusick et al. 1993a; Stepniewska y Kaas 1997;

Gray et al. 1999; Adams et al. 2000; Gutierrez et al. 2000), *Macaca fascicularis* (Stepniewska y Kaas 1997; Weller et al. 2002a) y *Macaca radiata* (Weller et al. 2002). También otras especies de

Olszewski (1952)	Stepniewska, Kaas (1997,2000)	Gutierrez (1995,2000)
<i>Citoarquitectura</i>	<i>Inmunohistoquímica (Cb), AChE y CyO, citoarquitectura y conectividad</i>	<i>Inmunohistoquímica (Cb, Pv y SMI-32) y AChE</i>
<b>PulO</b> : forma triangular, formado por células irregulares. Está separado del resto de divisiones	<b>PulA</b> : ídem PO	<b>PulA</b> : ídem PO
<b>PulM</b> : se encuentra por encima del ctt.	<b>PulM</b> : se encuentra por encima del ctt.	<b>PulMI</b> : moderada para las tres tinciones, aspecto con parches <b>PulMm</b> : menos intensidad que en PMI para todas las tinciones <b>PulMm-c</b> : se encuentra dentro de P mm y muestra mayor marcaje para AChE y Pv que la región que la rodea.
<b>PulL</b> : Ventral al ctt Formado por células pequeñas y atravesado por fibras orientadas horizontalmente	<b>PulLM</b> : Las células marcadas para Cat-301 se disponen de forma diferente a PLi y células de <b>PulL<sub>L</sub></b> : ídem PLm	<b>PulLd</b> : tinción densa para AChE, con un borde pobre en Cb y denso para Pv
<b>Pull</b> : Ventral al ctt No está atravesado por fibras	<b>Pull<sub>p</sub></b> : denso para Cb y moderado para AChE y CyO <b>Pull<sub>M</sub></b> : ligero para Cb y moderado para AChE y CyO <b>Pull<sub>CM</sub></b> : fuerte para Cb, ligero para AChE y CyO <b>Pull<sub>CL</sub></b> : moderado para Cb con neuronas oscuras dispersas y moderado para AChE y CyO	<b>Pull<sub>p</sub></b> : Intenso para Cb, ligero AChE y para SMI-32 ausente <b>Pull<sub>M</sub></b> : ligero para Cb, intenso para AChE en forma de parches y agrupamientos de células grandes <b>Pull<sub>C</sub></b> : intenso para Cb, moderado para AChE <b>Pull<sub>s</sub></b> : moderado con células grandes marcadas fuertemente, para SMI-32 con células grandes dispersas
		

**Tabla 2. Subdivisiones arquitectónicas del complejo pulvinar.**

Se recogen las diferentes nomenclaturas de división del complejo pulvinar de macaco. Tabla de elaboración propia, basada en los datos de: Gutierrez et al. (1995), (2000); Kaas y Collins (2003); Stepniewska y Kaas (1997)

primates han sido estudiadas: mono capuchino (*Cebus apella*, Gattas et al. 1978; Soares et al. 2001), mono ardilla (*Saimiri sciureus*, Cusick et al. 1993, Gray 1999, Stepniewska 2000, Weller et al. 2002), mono aullador (*Aoutus trivirgatus*, Stepniewska 1997, 1999, Weller et al. 2002) y tití común (Dick et al. 1991, Kaske 1991, Stepniewska 2000).

#### (1) Subdivisiones del núcleo pulvinar medial

Debido a que esta tesis se centra en PulM, realizaremos una explicación más detallada del patrón histoquímico descrito en el trabajo de Gutierrez et al. 2000 que reconoce varias subdivisiones en PulM:

- La región dorsolateral del PulM pasa a formar parte del PulL, considerándola como su región dorsal (PulLd); esta división se sustenta en su mayor tinción por AchE y moderada para Pv.
- La región adyacente al PulLd, se identifica como la porción intermedia del núcleo (PulMI). Es una región elongada que no se encuentra teñida de forma homogénea para la AchE como el PulLd, pero presenta gran reactividad para la Pv y Cb que adquieren un patrón de parches complementarios entre sí.
- La región más medial de PulM (PulMm), está limitada medialmente por los núcleos DM y Li. EL PulMm se distingue fácilmente del PulMI debido a su mayor reactividad para Pv y AchE. Dentro de este núcleo, su región dorsomedial presenta mayor reactividad para la AchE (Cavada et al. 1995) y, además, una tinción moderada para Pv y Cb con un patrón en parches complementarios como en PulMI.
- Por último, se describe una región central y ventral en el PulMm que presenta mayor tinción para la AchE y Pv (PulMm-c), rodeada por un halo de tinción más leve. En secciones coronales esta región oval tenía una anchura de entre 1-2mm y se extendía rostrocaudalmente en una distancia pequeña (1mm).

Así, el PuLM puede ser dividido en dos bandas diagonales, una medial (PulMm) y otra lateral (PulMI). Justo adyacente al PulM, el PulLd también conforma una banda diagonal en el extremo más lateral del núcleo. En PulMm, se aprecian parches con distinta reactividad de la enzima AchE que se corresponden con regiones conectómicas definidas (cf apartado 2.1.5).

Respecto al tití común, seguiremos la división arquitectónica de Paxinos et al. (2012), que se basa en la parcelación de Stepniewska y Kaas (1997) del complejo pulvinar realizada en macaco. Resumimos a continuación las subunidades que los componen. El PulL queda

inferiormente al ctt y se pueden identificar hasta cuatro subnúcleos: una porción posterior (PIp), una lateral (PIl), una centromedial (PIcM) y una centrolateral (PIcL). El PulL es considerado como un único núcleo que está atravesado por las fibras del ctt. El PulM está situado dorsalmente al ctt. El núcleo pulvinar anterior (PulA) se encuentra situado rostralmente al resto de subdivisiones y está formado por células irregulares y no presenta ninguna otra característica citoarquitectónica distintiva, lo que hace imprescindible su diferenciación en función de criterios conectómicos.

### *1.1.3. Mapas retinotópicos*

Además del estudio por quimioarquitectura, se ha realizado el estudio de los mapas retinotópicos del pulvinar con técnicas electrofisiológicas en monos aulladores (Allman et al. 1972), capuchinos (Gattass et al. 1978) y macacos (Bender 1981). De esta forma, al principio, Bender, en su trabajo de 1981, describió en mono Rhesus dos mapas visuales retinotópicamente organizados con gran representación del campo visual central: uno dentro del Pull (denominado posteriormente P1) y el segundo en el Pull (P2). Posteriormente en la misma especie, Petersen et al. (1985) describió otro mapa con una organización retinotópica cruda en la región dorsomedial del Pull (denominado posteriormente como P4).

En el mono capuchino, (Gattass et al. 1978; Soares et al. 2001), describieron dos mapas, uno localizado en la porción ventrolateral que comprende el Pull y la porción ventral del Pull (homólogo a P1) con gran representación de la parte central del campo visual, y el segundo mapa, llamado P $\mu$  (equivalente a P4) está localizado en la región dorsomedial del Pull que tiene principalmente representación de la periferia del campo visual. Sin embargo, estos mapas no se pueden trasladar directamente a otros primates, ya que, por ejemplo, en el mono aullador se observó la existencia de un único mapa (P1) retinotópico (Allman et al. 1972).

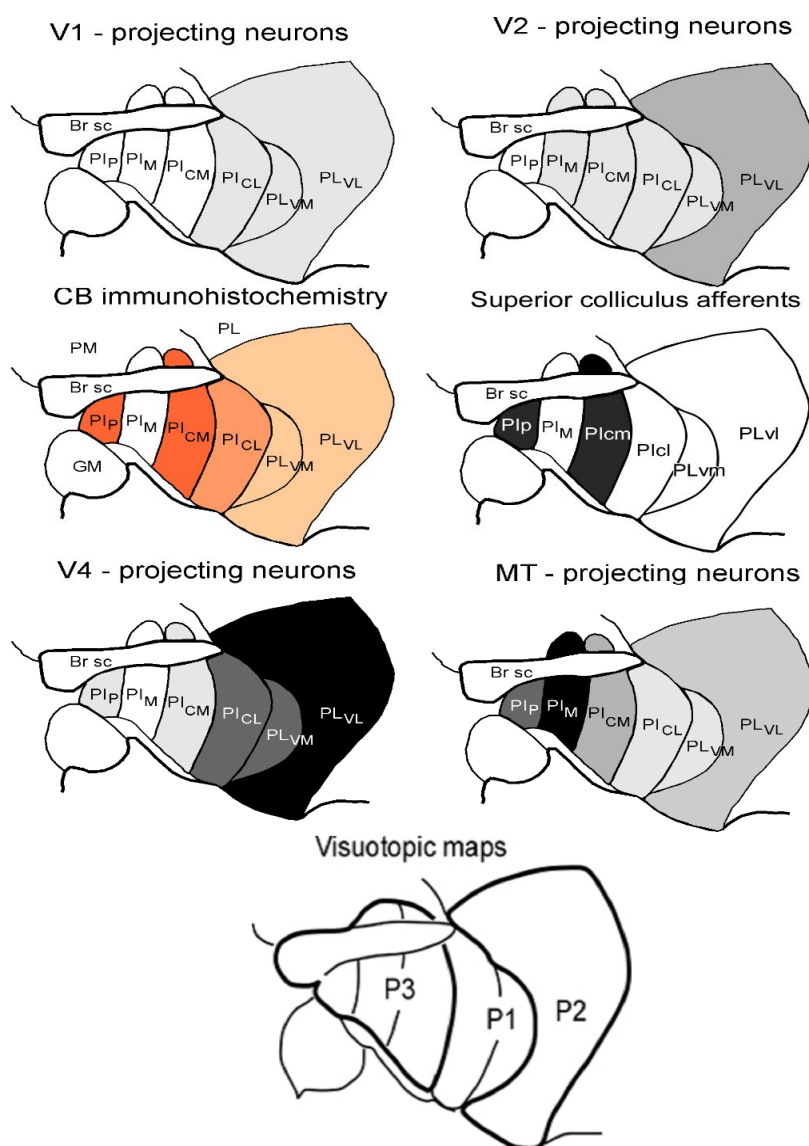
En trabajos posteriores, Ungerleider et al. (1984) basándose en la conectividad definieron un tercer mapa (P3) en función de su conectividad diferencial con MT, este mapa no presenta una organización visuotópica muy elaborada.

### *1.1.4. Relaciones entre las subdivisiones químicas y funcionales*

En algunos casos, se puede relacionar la organización quimioarquitectónica con la conectividad del núcleo. En la **Figura 9**. se resumen la relación entre la inmunorreactividad para Cb, las conexiones con otras áreas corticales (V1, V2, V4, MT y SC) y la presencia de mapas retinotópicos. Se puede observar una clara correlación entre la mayor intensidad de inmunoreactividad para calbindina y las aferencias desde el colículo superior; observando para



las regiones con conexiones con MT se observa relación inversa. Además, apreciamos que el campo retinotópico P3 no recibe información desde V1, estando formado principalmente por aferencias desde colículo superior y desde MT. Los campos P1 y P2 reciben desde V1, V2 y V4, siendo más pronunciadas las conexiones de las dos últimas cortezas a P2.



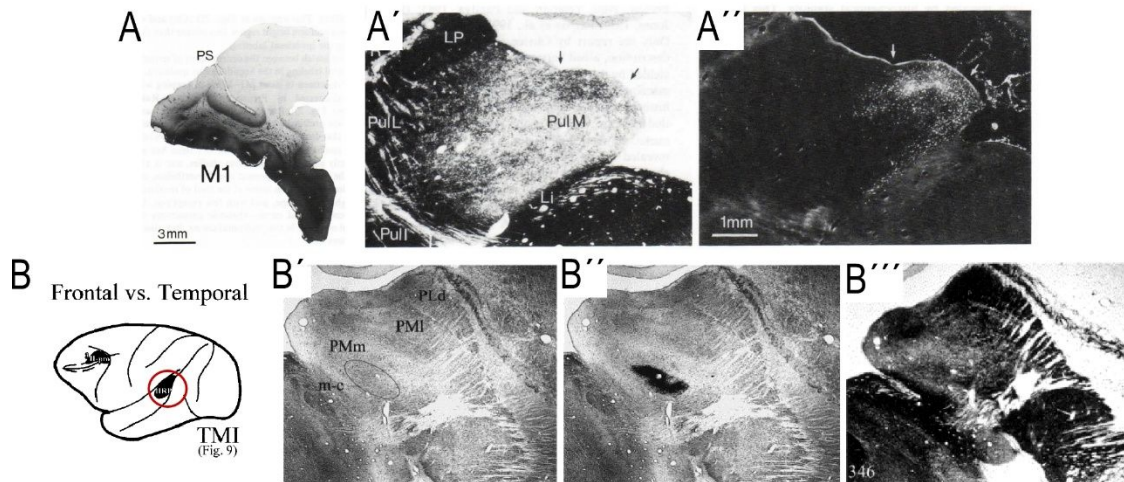
**Figura 9. Relación para características de conectividad y quimioarquitectónicas de los componentes del pulvinar inferior de macaco.**

La delimitación sigue el criterio de Stepniewska et al. (1997) y los mapas retinotópicos (derecha) y conectividad con cortezas visuales han sido tomados de Ungerleider et al. (1984). Los datos de conectividad con colículo superior han sido tomados del trabajo de (Stepniewska et al. 2000) Modificado de (Adams et al. 2000).

En tonos de grises se indica la densidad de proyecciones hacia determinadas áreas corticales, en colores fuertes se indica alta densidad y en grises tenues baja densidad. La inmunohistoquímica para calbindina también ha sido representada en tonos de naranja.

Dentro de la región dorsal del pulvinar, algunos autores también han encontrado áreas definidas neuroquímicamente con una conectividad específica. Por una parte, en el trabajo de Cavada et al. (1995) se describe la existencia de un parche en la región dorsal y medial del pulvinar con mayor inmunoreactividad para la AchE, este parche además presentaba gran cantidad de somas marcados, restringidos a él, tras realizar un depósito de HRP en corteza orbitofrontal (**Figura 10 A-A''**). En el trabajo de Gutierrez et al. (2000) se describe otro sector, denominado PulMm-c, que tiene forma oval, presenta mayor tinción de AchE y Pv, y está

localizado en la región ventral del PulM. Este sector recibe de forma consistente inervación desde depósitos realizados en la corteza del giro temporal superior (**Figura 10 B-B''**).



**Figura 10. Especificidad bioquímica de poblaciones TC inmunopositivas para acetilcolinesterasa que proyectan a corteza orbitofrontal y temporal superior.**

**A-A''**: Modificado de C. Cavada et al. (1995), A: depósito de HRP en corteza orbitofrontal de macaco. A': histoquímica para la enzima acetilcolinesterasa. A'': somas marcados en pulvinar medial tras realizar el depósito en corteza orbitofrontal.

**B-B'''**: Modificado de Gutierrez et al. (2000). B: región del depósito con aminoácidos tritiados en la corteza temporal superior. B': sección en la que se ha realizado inmunohistoquímica para la Pv. B'': la misma sección de B' en la que se ha realizado el revelado del marcado. B''': sección de un nivel adyacente con histoquímica para la AchE.

#### 1.1.5. Citología de las neuronas que componen el complejo pulvinar

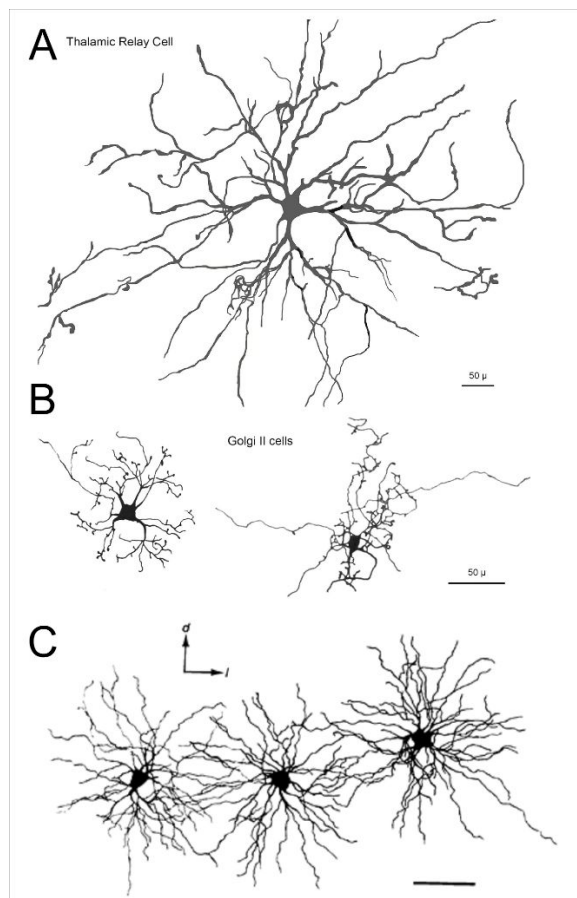
Dentro del complejo pulvinar se han descrito dos tipos de neuronas, las neuronas de proyección o TC y las interneuronas de circuito local (Jones 2007). Utilizando la técnica de Golgi, Ogren y Hendrickson (1979) reconstruyeron ambos tipos neuronales en las subdivisiones PulL y Pull del complejo pulvinar de macaco. Según estos autores las neuronas TC en estos núcleos presentan una media de 26µm de diámetro mayor y exhiben un patrón dendrítico radial en un rango entre 150-600 µm de diámetro. El segundo tipo de célula es la Golgi tipo II o interneurona, que presentan alrededor 16 µm de diámetro y un axón que ramifica en la vecindad del soma (**Figura 11 A-B**). Las neuronas TC se encuentran en una ratio de 7:3 respecto a las Golgi tipo II en PulL y Pull, y de ratio 9:2 en PulM.

En el trabajo de Imura y Rockland (2007) se describe lo que parece ser un tercer tipo de neurona TC en Pull, denominadas como células gigantes. Estas células se encontraban entre las neuronas marcadas con trazadores retrógrados tras realizar depósitos de trazadores en el lóbulo temporal y se caracterizan por tener un tamaño medio de 40µm<sup>2</sup>, y un diámetro mayor de 42,5µm. Estas neuronas tienden a ser solitarias estando espaciadas unos 300-500µm. Se



encuentran concentradas lateralmente, en una localización próxima al tracto córticotectal (ctt) y son inmunopositivas para Cb. Se encontraban lejos del foco de somas marcados tras la inyección en corteza.

Posteriormente, en el estudio de Ma et al. (1998) se analizaron en profundidad las neuronas del PulM. Las comparaciones del tamaño de soma de las neuronas TC del PulM ( $41\mu\text{m}^2$ ) respecto al PulL (media  $44\mu\text{m}^2$ ) y el PulL ( $46\mu\text{m}^2$ ), indica que en PulM el tamaño de somas TC es más pequeño. Además, estos autores distinguieron entre tipos de neuronas TC en base a los diámetros de sus árboles dendríticos (TC1 y TC2). Ambas variedades presentaban dendritas cortas que se irradiaban en todas las direcciones. Una característica que llamó la atención de estos investigadores fue que las neuronas de proyección tienen campos dendríticos solapados (**Figura 11-C**). El tipo más común de neuronas eran las TC1 y presentaban un árbol dendrítico de hasta  $270\mu\text{m}$ . El tipo menos frecuente (TC2) presentaban un árbol dendrítico mayor de hasta  $380\mu\text{m}$ . Aunque la mayoría de células tenían una distribución isodendrítica, en los bordes del pulvinar, particularmente en su borde lateral, unas pocas de ellas tenían los arboles dendríticos orientados hacia el interior del PulM. Otra diferencia de las TC2 es que tienen dimensiones somáticas mayores, representando las células más grandes analizadas en ese trabajo.



**Figura 11. Reconstrucciones de somas y árboles dendríticos de neuronas del pulvinar teñidas con la técnica de Golgi.**

**A:** reconstrucción de una neurona de proyección del pulvinar inferior.

**B:** reconstrucciones de dos interneuronas (células de Golgi tipo II) del pulvinar lateral.

**C:** Reconstrucciones de neuronas de proyección del pulvinar medial, nótese el importante solapamiento de sus árboles dendríticos.

A-B Tomado de Ogren y Hendrickson (1979). C de Ma et al. (1998).

## 1.2. Conectividad del complejo pulvinar

Debido a sus conexiones, el complejo pulvinar es considerado como un núcleo talámico asociativo o de alto orden (Sherman y Guillery 1996). Tanto en el macaco como en los primates del nuevo mundo, el rango de inervación desde el complejo pulvinar abarca desde cortezas visuales extraestriadas (Dick et al. 1991), a cortezas con función cognitiva de la corteza prefrontal y en las cortezas parietales de asociación. Estas conexiones parecen estar organizadas topográficamente y como resultado, el complejo pulvinar considerado en su conjunto contiene un mapa completo de la superficie cortical, aunque con una topografía complicada y distorsionada (Shipp 2001, 2003). De forma general, los núcleos Pull y PulL reciben conexiones de la corteza estriada y extraestriada (Dick et al. 1991; Kaske et al. 1991). El núcleo PulA tiene conexiones exclusivamente con corteza somatosensorial y el PulM con múltiples regiones corticales multisensoriales (Stepniewska 2003; Kaas y Lyon 2007). En la **Figura 12**, se ilustra la conectividad global de las subdivisiones del complejo pulvinar.

### 1.2.1. Conectividad subcortical del complejo pulvinar.

#### (1) Aferencias subcorticales

De la misma forma que en el resto de núcleos talámicos, el pulvinar recibe aferencias desde el NRT que, presumiblemente, provee de retroalimentación GABAérgica a todas las subdivisiones del pulvinar. Esto ha sido estudiado principalmente en el pulvinar visual (Pull y PulL) de gato (Baldauf 2010) y en prosimio (Conley y Diamond 1990), no se ha realizado un estudio sistemático de las conexiones entre los componentes del complejo pulvinar y el NRT en primates. En el trabajo de Conley y Diamond (1990) se describe que las conexiones del núcleo pulvinar superior y geniculado lateral ocupan regiones separadas dentro del NRT.

Las aferencias colinérgicas del complejo pulvinar han sido analizadas en macaco y provienen de los grupos Ch5 (núcleo pedúnculo pontino), Ch6 (núcleo tegmental dorsolateral) y Ch8 (parabigeminal) (Lysakowski et al. 1986). El complejo pulvinar del mono ardilla y el de macaco rhesus, también recibe aferencias noradrenérgicas con gran densidad, y moderadas de serotonina desde el tronco del encefalo (Morrison y Foote 1986). En *macaca nemestrina*, se encontraron aferencias noradrenergicas en baja concentración (Rico y Cavada 1998). Finalmente, el pulvinar recibe aferencias dopaminérgicas, no tan densas como las observadas en otros núcleos talámicos como el dorsomediano y núcleos de la línea media (García-Cabezas et al. 2007, 2009), aunque se desconoce en el complejo pulvinar su origen (Sánchez-González et al. 2005).

El Pull recibe aferencias de las capas superficiales del colículo superior (Adams et al. 2000, Lyon et al. 2010, Kaas y Lyon 2007, Padmala et al. 2010), y el PulM recibe aferencias desde las capas profundas (Benevento y Standage 1983), aunque las inyecciones que originaron somas marcados en CS se encontraban en una región muy lateral del PulM que podría considerarse según nuestra delimitación como parte del Pull.

Finalmente, se han descrito escasas proyecciones originadas en la retina contralateral en el Pullm (tití común, Warner et al. 2010; macaco, Itaya y Van Hoesen 1983; Nakagawa y Tanaka 1984; O'Brien et al. 2001).

## (2) Eferencias subcorticales. Complejo amigdalino

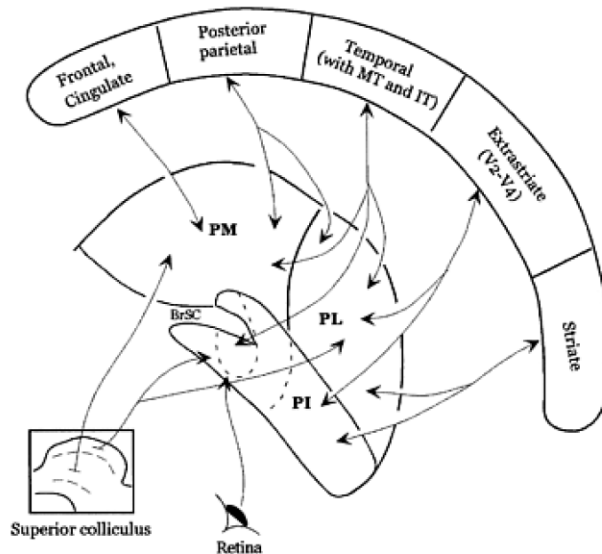
Las proyecciones desde el complejo pulvinar al núcleo lateral del complejo amigdalino han sido descritas con trazado neuronal en el PulM de primates (Jones y Burton 1976a; Aggleton et al. 1980; Romanski et al. 1997) y en el pulvinar dorsal de la tupaya arborícora (Day-Brown et al. 2010). En humanos esta conectividad ha sido analizada por medio de tractografía (Tamietto et al. 2012, Abivardi et al. 2017). Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios; en el trabajo de Mehler (1980) no se detectó esta aferencia y las inyecciones masivas de Aggleton et al. (1980) sólo detectaron escaso numero de somas marcados. Además, los estudios de trazado anterógrado en PulM involucran inyecciones masivas dentro de este, que podrían implicar contaminación de otro núcleos o fibras de paso; este es el caso de las inyecciones de los trabajos de Jones y Burton 1976a, y Romanski et al. 1997. De este modo, se hace necesario la realización de más experimentos que resuelvan del todo la cuestión de la conectividad entre PulM y el complejo amigdalino.

### *1.2.2. Conexiones de los núcleos inferior, lateral y anterior del complejo pulvinar*

El Pull, está conectado bidireccionalmente con áreas corticales visuales entre los que se incluyen la corteza estriada, corteza extraestriada y el área MT (Asanuma et al. 1985, Stepniewska 2003, Gutierrez et al. 1995, Weller et al. 2002). Algunas regiones del Pull conectan también con áreas visuales asociativas de la corteza temporal inferior (Rockland et al. 1999; Gutierrez et al. 2000).

En el núcleo pulvinar lateral se puede distinguir una región ventral conectada con las áreas visuales organizadas retinotópicamente (Ungerleider et al. 1983; Stepniewska y Kaas 1997; Gutierrez et al. 2000; Stepniewska 2003) y una región dorsal que no proyecta ni recibe proyección de áreas visuales, pero que si tiene conexiones con áreas multimodales de asociación de los lóbulos parietal y frontal (Gutierrez et al. 1995, 2000).

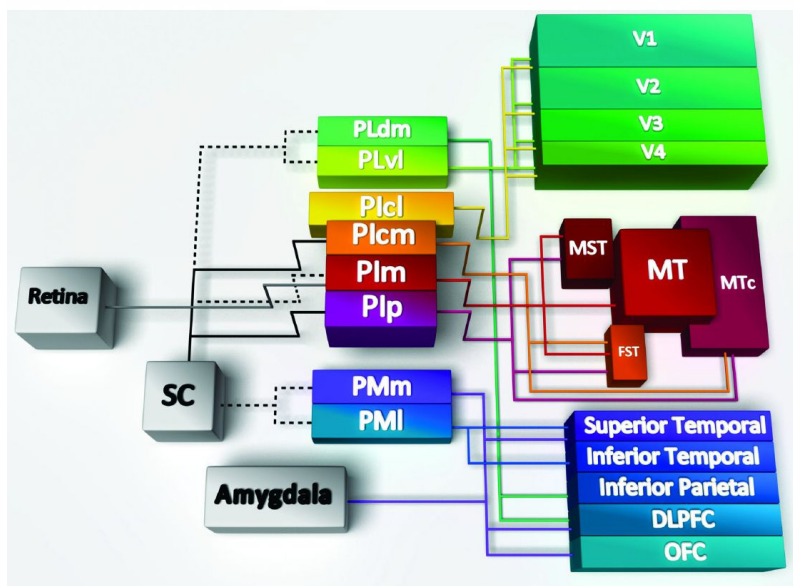
Aunque los componentes lateral e inferior del pulvinar proyectan a cortezas visuales, se observa una segregación en el patrón de conectividad de cada núcleo. De esta forma, la región ventral del PulL se encuentra asociada con las áreas corticales de la corriente ventral, mientras que el PulL está asociado con las áreas de la corriente dorsal (revisado en Kaas y Lyon 2007).



**Figura 12. Resumen de la conectividad del complejo pulvinar.**

Superior: ilustración de un nivel coronal del complejo pulvinar, según la delimitación de Kaas, con sus dianas de proyección corticales y sus aferencias subcorticales. Tomado de (Stepniewska 2003).

Inferior: Esquema de cajas que muestra las relaciones entre las diferentes subunidades del pulvinar con regiones corticales y subcorticales. Tomado de (Bridge et al. 2016).



El núcleo pulvinar anterior, fue descrito en mono Rhesus como parte del sistema somatosensorial ya que está conectado con estructuras somatosensoriales (Gutierrez et al. 1995; Huffman y Krubitzer 2001). Se ha descrito por medio de trazado retrógrado que el PA proyecta principalmente a la corteza parietal posterior superior (área PE) (Schmahmann y Pandya 1990) y también escasamente a la parte ventral de la región parietal posterior inferior (áreas PF, PFG y

PG) (Asanuma et al. 1985). Además, es el único componente del complejo pulvinar que proyecta a regiones de la corteza somatosensorial primaria; concretamente, proyecta hacia la región de la representación de la mano de las cortezas 3b (Cerkevich et al. 2013) y en áreas 2/5 (Darian-Smith et al. 1990). Otras cortezas como la insular (Mufson y Mesulam 1984a) y la corteza temporal superior (Yeterian y Pandya 1989) reciben proyecciones de PulA. Esta subdivisión sólo ha sido investigada de forma marginal en el tití común.

### *1.2.3. Conexiones del núcleo pulvinar medial*

El núcleo pulvinar medial es un núcleo con una topografía complicada, en el que confluyen conexiones de un amplio abanico de áreas corticales, desde regiones corticales de funciones visuales complejas en la corteza visual extraestriada, corteza parietal posterior y corteza inferotemporal, auditivas asociativas en las áreas del “belt” y “parabelt” (Grieve et al. 2000), hasta cortezas de funciones cognitivas en la corteza prefrontal, áreas de asociación paralímbicas, corteza insular y corteza cingular, y por último áreas multimodales en la corteza temporal superior (Gutierrez et al. 2000; Padmala et al. 2010).

Mediante técnicas de trazado anterógrado, en macacos se ha estudiado el patrón global de las conexiones del PulM, sin embargo, los estudios publicados son muy escasos y utilizaron grandes inyecciones de depósitos que no permiten observar la posible topografía en las conexiones. Concretamente, el análisis en tití común de estas conexiones con técnicas anterógradas de gran sensibilidad (BDA) son de gran importancia al ser un modelo animal cuyo uso experimental está en auge, constituyendo el modelo de experimentación del proyecto nacional Brain/MINDS de Japón (Okano et al. 2016) debido a que su pequeño tamaño facilita su manejo y que al ser primates posibilitan el estudio de funciones cognitivas como el comportamiento social (Miller et al. 2016). Describiremos, los estudios anterógrados en una subsección de este apartado.

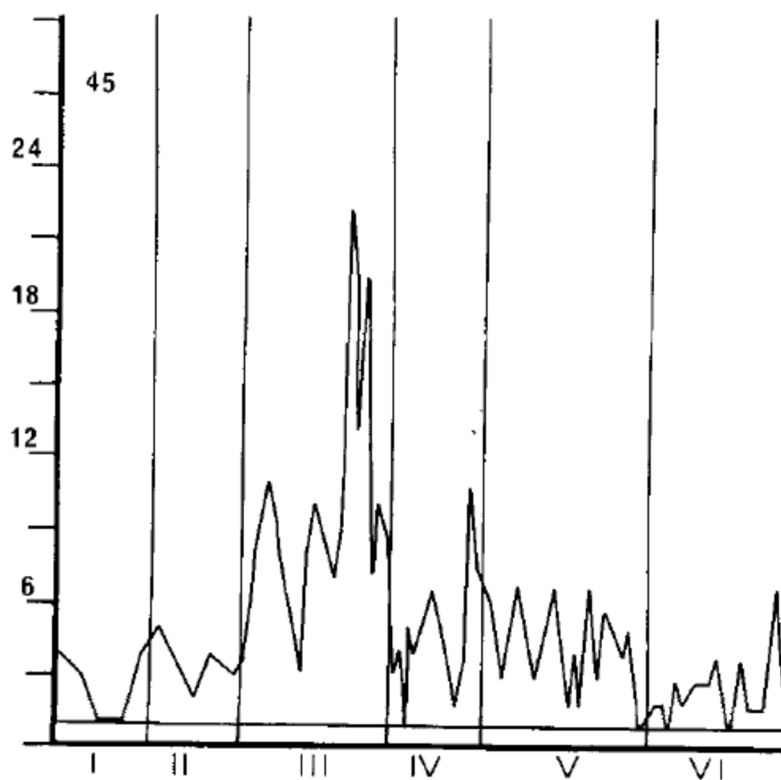
Los estudios realizados con trazadores axonales retrógrados son numerosos y han generado un gran corpus de datos principalmente en macaco. Debido a que la topografía es muy complicada, hemos decidido abordar la descripción de los trabajos de trazado retrógrado en cada lóbulo o región cortical por separado. La mayoría de los datos provienen de estudios de trazado retrógrado con HRP y en años más recientes, con trazadores retrógrados fluorescentes.

### (1) Patrón global de las aferencias corticales desde el núcleo pulvinar medial. Trabajos de trazado anterógrado.

La mayor parte del estudio anterógrado de las conexiones TC realizado en primate se fundamenta en el uso de depósitos de aminoácidos tritiados en tálamo. Estos depósitos pese a ser generalmente de gran tamaño, lo que dificulta el análisis de la topografía, son valiosos porque permiten analizar el patrón global cortical de las conexiones que proyectan a partir de regiones específicas de tálamo.

En estos estudios se ha descrito que la parte caudal del PulM, en su región ventral-medial proyecta ampliamente y de forma específica a la corteza temporal inferior (TE3), con origen desde su región polar a gran parte de su extensión. Además, se apreciaba granulado en el núcleo basolateral de la amígdala. Estos datos se obtuvieron en macaco y mono ardilla (Burton y Jones 1976). En la misma posición del núcleo mencionada anteriormente, con un depósito que presentaba mayor implicación rostral, se describieron proyecciones del PulM hacia el lóbulo frontal. Donde intervenían dos regiones, una región localizada en la porción anterior del brazo inferior del Surco arcuato (SA) y la otra en la región orbital del lóbulo prefrontal (Bos y Benevento 1975).

En otro estudio coetáneo, con depósitos ventrales pero que afectaban una región lateral mayor del núcleo, se describieron proyecciones en una amplia región de la OFC, corteza prefrontal lateral ventral en su nivel A-P intermedio y en la región superior del lóbulo temporal que se continua dentro del STS hasta niveles caudales. Cuando el depósito se localiza en la zona de frontera entre PulL y PulM, desaparece el componente a corteza prefrontal y a temporal polar y en cambio el componente a temporal inferior y al interior del STS se hace predominante, también se observa ligera inervación de la porción caudal de la corteza parietal (Trojanowski y Jacobson 1976). Otro estudio (Baleydier y Mauguier 1985a) realizado con un depósito de aminoácidos tritiados en la parte medial del PulM caudal, presentaba inervación en el lóbulo parietal posterior (área PG), corteza cingular posterior, temporal superior y ventral (parahipocampo, TH y TF).



**Figura 13. Perfil de cantidad de granos de plata contados tras un depósito de aminoácidos tritiados en pulvinar medial en el área prefrontal de macaco.**

Se observa la elevada cantidad de granos contados en la capa III profunda (Trojanowski y Jacobson 1976).

En el trabajo de Trojanowski y Jacobson 1976 se analizó la distribución laminar de las proyecciones aferentes en corteza desde los núcleos PulM, Pull y PullL. A pesar de que cada subunidad del pulvinar posee una conectividad completamente diferente, dentro de las áreas corticales diana de cada una, el patrón de distribución laminar era similar. De este modo, al medir la densidad de granos de plata obtenidos de segmentos transversos que contenían las regiones de innervación, obtuvieron la mayor densidad en la capa 3b para todos los casos (**Figura 13**). En otro estudio se observó el mismo patrón en el PulA cuando innervaba área 5 (Jones y Burton 1976b). Y finalmente, todas las áreas con marcado del trabajo de Baleyrier y Mauguier (1985) presentaban un patrón laminar dirigido a las capas 4, 3b y 1.

Posteriormente, se realizó otro trabajo en PulM de macaco con depósitos masivos utilizando trazador bidireccional (con transporte anterógrado y retrógrado) WGA-HRP (Romanski et al. 1997). Las inyecciones localizadas en la parte central/lateral del PulM, revelaron proyecciones extensas en áreas corticales de asociación incluyendo amplias regiones de PFC dorsolateral (área 46 y 8a), ventrolateral (área 45), medial (área 12) y corteza orbitofrontal (áreas 11 y 13), insular granular y disgranular, el banco superior del STS y gran parte del STG, en las áreas 7a, 7b y 7ip de la corteza parietal posterior y en la corteza cingular posterior. Las conexiones de la porción medial eran más escasas en PFC dorsolateral (áreas 9,10 y 32) y medial

(áreas 25 y 24) y se dirigían principalmente a la región rostral del STG y parte rostral del borde superior del STS, corteza cingular posterior y a la amígdala. En cuanto a la distribución laminar, los terminales se localizaban invariablemente en la capa 4 y 3b (Romanski et al. 1997) y no apreciaban el componente a capa 1 descrito por Baleyrier y Mauguier (1985).

## (2) Topografía de las poblaciones tálamo-corticales en el pulvinar medial con análisis de trazado retrógrado

Enfocamos el estudio de la extensa bibliografía de trabajos con depósitos retrógrados en corteza que describían somas marcadas en PulM de la siguiente forma. Primero, realizamos una lectura en profundidad de los trabajos realizados en cada uno (Tabla resumen de referencias bibliográficas). A continuación, superpusimos las imágenes de marcado en PulM que mostraban los diferentes trabajos en la sección estándar coronal del complejo pulvinar que les correspondía. Escogimos una progresión anteroposterior (A-P) de cinco niveles coronales del complejo pulvinar obtenidas del atlas de Olzewski 1950. Con los datos de somas marcadas en PulM y la localización en corteza de los depósitos retrógrados realizamos gradientes de innervación que fueron correlacionados y dibujados en corteza utilizando una reconstrucción bidimensional de la superficie cortical del macaco (**Figura 14**) obtenido del trabajo de Markov et al. (2014). Para referencia, mostramos las superficies medial y lateral del hemisferio antes del aplanamiento (A) y la reconstrucción bidimensional obtenida (B).

### (a) Proyecciones hacia la corteza prefrontal

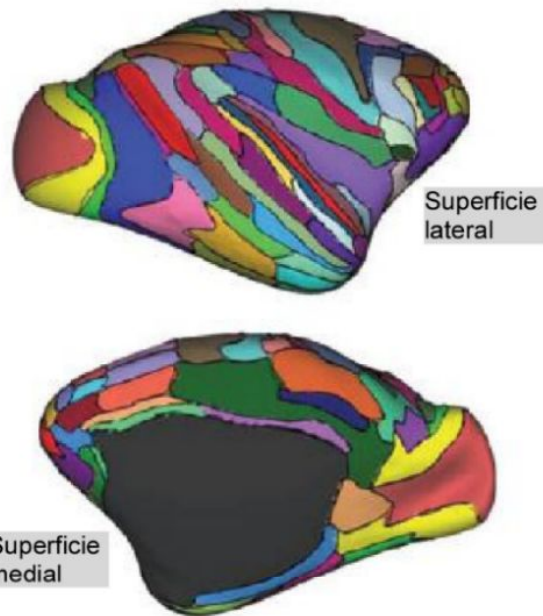
Las proyecciones a corteza prefrontal desde el PulM han sido descritas de forma consistente en numerosos estudios (cf. **Tabla 3**). Sin embargo, no hay que perder de vista que la principal fuente de aferencias talámicas a la corteza prefrontal proviene del núcleo dorsomediano (DM) (Romanski et al. 1997). En el trabajo de Goldman-Rakic y Porrino (1985) se realizaron depósitos de forma sistemática en corteza prefrontal, en la **Figura 15** se muestran las reconstrucciones de la localización de los somas en PulM. Se puede apreciar en el mismo nivel A-P cierta topografía de las proyecciones hacia corteza prefrontal dentro del núcleo. Finalmente, concluimos este apartado con la síntesis gráfica de estas proyecciones en macaco que hemos elaborado en base a los datos bibliográficos (**Figura 16**).



## Codificación áreas corticales

10	OPAI
11	OPRO
12	PBc
13	PBr
14	PGa
1	PIP
23	Perirhinal
24a	Parainsula
24b	Piriform
24c	Pro.Striate
24d	ProM
25	Sil
29/30	STPc
2	STPi
31	STPr
32	Subiculum
3	Temp. Pole
44	TEO
45A	TEOm
45B	TEam a
46d	TEam p
46v	TEad
5	TEav
7A	TEpd
7B	TEpv
7m	TH/TF
7op	TPI
8B	V1
8l	V2
8m	V3A
8r	V3
9	V4
9/46d	V4t
9/46v	V8A
AIP	V8
Cons	VIP
DP	
Entorhinal	
F1	
F2	
F3	
F4	
F5	
F6	
F7	
FST	
Gu	
IPa	
Insula	
LB	
LIP	
MB	
MIP	
MST	
MT	
MEDIAL WALL	

## A Hemisferio cerebral suavizado



## B Mapa plano de la superficie cortical

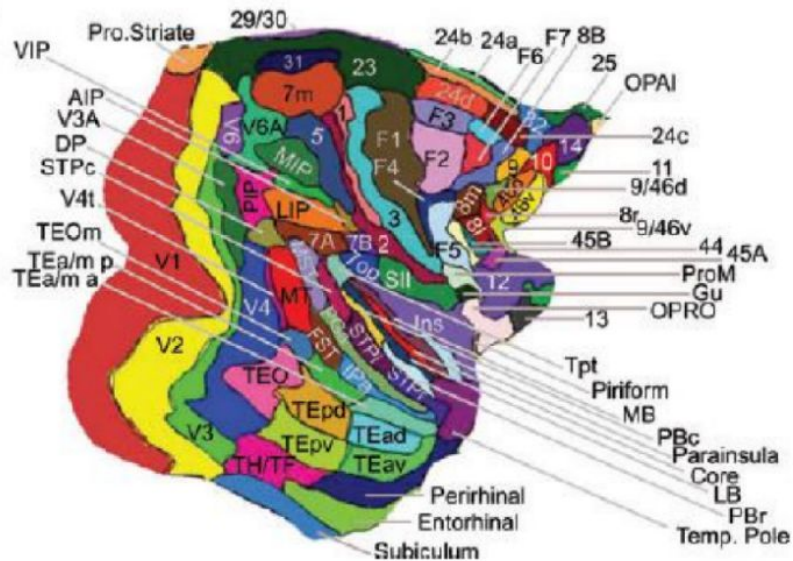


Figura 14. Reconstrucción bidimensional de la superficie neocortical de macaco (*macaca fascicularis*).

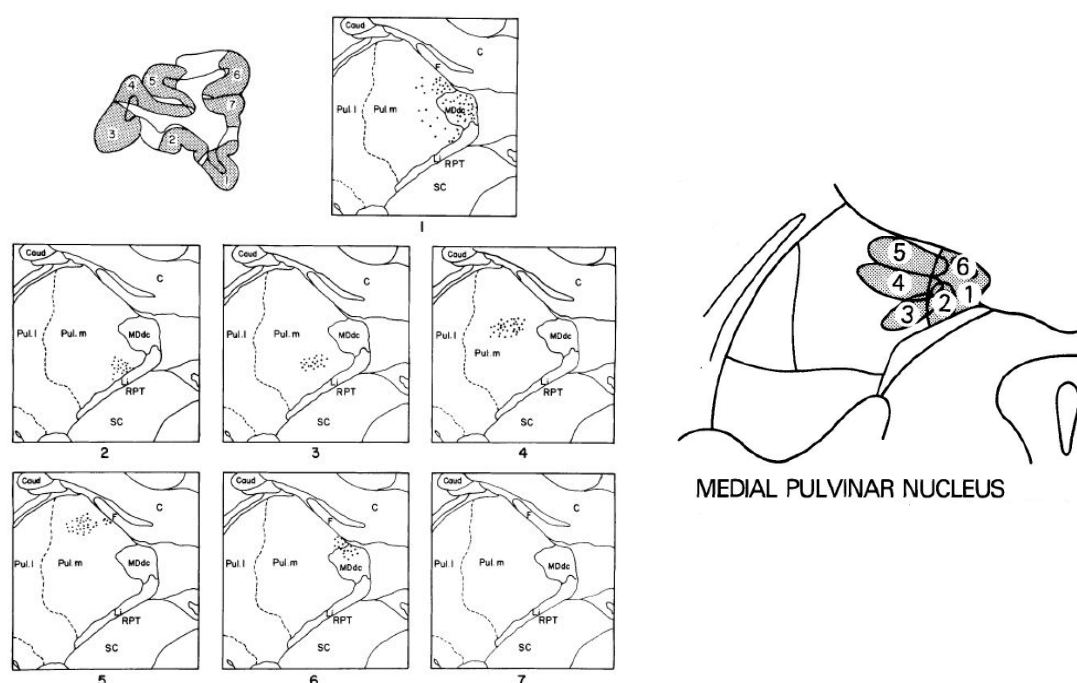
A: Superficie lateral y medial del hemisferio cerebral en el que se ha realizado un efecto de suavizado/inflado para permitir el análisis de la corteza oculta en los surcos.

B: Reconstrucción bidimensional de baja distorsión de la superficie cortical, obtenido con el programa informático caret en el que se han dibujado los límites de las áreas corticales.

Imagen modificada de (Markov et al. 2014)

(i) *Aferencias a corteza orbitofrontal y medial*

A lo largo de la revisión bibliográfica, hemos observado discrepancias en el componente orbitofrontal y medial descrito. Esto se debe principalmente a diferencias en la delimitación del extremo caudal del DM. Para muchos autores esta esquina se extiende caudalmente en bastantes niveles coronales y llega a ocupar una porción variable del PulM. En los casos que sea necesario comentaremos estas diferencias e intentaremos describir los datos en función de cómo el autor del trabajo ha delimitado estos núcleos. En **Tabla 3**, se recogen las referencias bibliográficas utilizadas en este análisis.



**Figura 15. Proyecciones del PulM hacia áreas seleccionadas de la corteza prefrontal.**

**Izquierda:** localización de las poblaciones neuronales dentro del mismo nivel de PulM que innervan distintas regiones de la corteza prefrontal. Se observa cierta topografía de las proyecciones dependiendo del área cortical innervada, nótese la ausencia de marcado en el caso con depósitos en prefrontal medial.

**Derecha:** Topografía propuesta de las conexiones pulvino-prefrontales en PulM  
Tomado de (Goldman-Rakic y Porrino 1985a).

Empezaremos describiendo los resultados previos que se han hecho en la corteza orbitofrontal (OFC), principalmente en las áreas 11, 13, y 14. En las regiones más caudales del OFC, como son las cortezas OPro y OPAl, solo hay un trabajo que describe periféricamente somas marcados en la esquina medial PulM caudal (Morecraft et al. 1992). La conectividad general de esta región cortical está explicada en la revisión de Cavada et al. (2000) en macaco. En la región dorsomedial del pulvinar se ha descrito en macacos una región con mayor actividad para la enzima AchE que conecta de forma selectiva con la OFC (Cavada et al. 1995) (**Figura 10**). En el trabajo de Cavada et al. (1995) tras realizar un depósito de HRP que ocupaba gran parte del OFC

se describe una gran cantidad de proyecciones en la porción medial del PulM. Los somas se agrupan formando una banda diagonal en la esquina medial del núcleo en niveles anteroposteriores (A-P) rostrales a intermedios.

REGIÓN CORTICAL	AREA CORTICAL	AUTORES	Animal de experimentación	Técnica
Orbitofrontal	A11	<b>Roberts et al. 2007*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
		Barbas et al. 1991	<i>M. mulatta</i>	HRP
		Cavada et al. 2000	<i>M. nemestrina</i>	HRP
	A13M	<b>Roberts et al. 2007</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Goldman-Rakic y Porrino 1985	<i>M. mulatta</i>	HRP, FB y DY
		Cavada et al. 1995/2000	<i>M. nemestrina</i>	HRP, HRP-WGA
Prefrontal ventrolateral	A47L (A12)	Morecraft et al. 1992	<i>M. mulatta</i> y <i>M. fascicularis</i>	HRP
		<b>Roberts et al. 2007</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
		Goldman-Rakic y Porrino 1985	<i>M. mulatta</i>	HRP, FB y DY
	A45	Barbas et al. 1991	<i>M. mulatta</i>	HRP
		<b>Roberts et al. 2007*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
		Asanuma et al. 1985	<i>M. fascicularis</i>	AA, NY, FB, TB
		Huerta et al. 1986	<i>S. sciureus</i> , <i>A. trivirgatus</i> , <i>M. fascicularis</i>	HRP-WGA
	A47O	Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
Prefrontal dorsolateral	A8aD	<b>Roberts et al. 2007*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Kievit and Kuypers 1977	<i>M. mulatta</i>	HRP
		Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
		Trojanowski and Jacobson 1974	<i>M. mulatta</i>	AA, HRP
		<b>Brysch et al. 1990*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
	A8aV	<b>Roberts et al. 2007*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Asanuma et al. 1985	<i>M. fascicularis</i>	AA, NY, FB, TB
		Trojanowski and Jacobson 1974	<i>M. mulatta</i>	AA, HRP
		Huerta et al. 1986	<i>S. sciureus</i> , <i>A. trivirgatus</i> , <i>M. fascicularis</i>	HRP-WGA
		Morecraft et al. 1993	<i>M. fascicularis</i> , <i>M. mulatta</i>	HRP
		Barbas et al. 1991	<i>M. mulatta</i>	HRP
	A46V	<b>Brysch et al. 1990*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		<b>Roberts et al. 2007*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
		Goldman-Rakic y Porrino 1985	<i>M. mulatta</i>	HRP, FB y DY
		Asanuma et al. 1985	<i>M. fascicularis</i>	AA, NY, FB, TB
		Barbas et al. 1991	<i>M. mulatta</i>	HRP
Prefrontal medial	A9	Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
	A32	<b>Roberts et al. 2007*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Barbas et al. 1991	<i>M. mulatta</i>	HRP
Prefrontal polar	A14	Barbas et al. 1991	<i>M. mulatta</i>	HRP+FB
		Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
		Goldman-Rakic y Porrino 1985	<i>M. mulatta</i>	HRP, FB y DY
		Burman et al. 2011	<i>C. jacchus</i>	DY, FB y FR

**Tabla 3. Referencias bibliográficas de las aferencias del PulM al lóbulo prefrontal**

En negrita y con asterisco están señalados los trabajos realizados en tití común

Con depósitos más pequeños, en el trabajo de Goldman-Rakic y Porrino (1985) tras inyectar en la región más ventral de la OFC (áreas 14R y 13b), también observaron marcado en

la esquina medial del tálamo caudal que nombraron como parte del DM densocelular en vez de como parte del PulM como han considerado otros autores (Cavada et al. 1995). Sin embargo, una inyección más lateral en la OFC (áreas 11 y 13L), presentaba un marcado en PulM algo más lateral y ventral.

En el extenso trabajo de Barbas et al. (1991) también se describieron proyecciones desde el PulM a corteza orbifrontal y describieron cierta topografía de las proyecciones desde PulM. Observaron que regiones rostrales de OFC recibían inervación desde la esquina medial del PulM caudal. En niveles más caudales de OFC, las aferencias desde PulM se localizaban en una posición central en niveles rostrales respecto a las proyecciones que se dirigen a OFC rostral, estas somas se agrupaban formando una banda horizontal.

Algunos trabajos presentan inconsistencias en la descripción de estas proyecciones, es el caso de Romanski et al. 1997, que observa que las aferencias hacia el área 11 se originan de la zona central del PulM.

En la corteza prefrontal medial, se observa que en su región central (área 32) recibe aferencias desde la región medial del PulM caudal, y en la región ventral de corteza (área 14), se aprecia marcado poco denso en una región ventral-medial dentro del PulM caudal (Barbas et al. 1991). Sin embargo, en otros estudios, las aferencias al área 32 desde PulM no se aprecian (Goldman-Rakic y Porrino 1985).

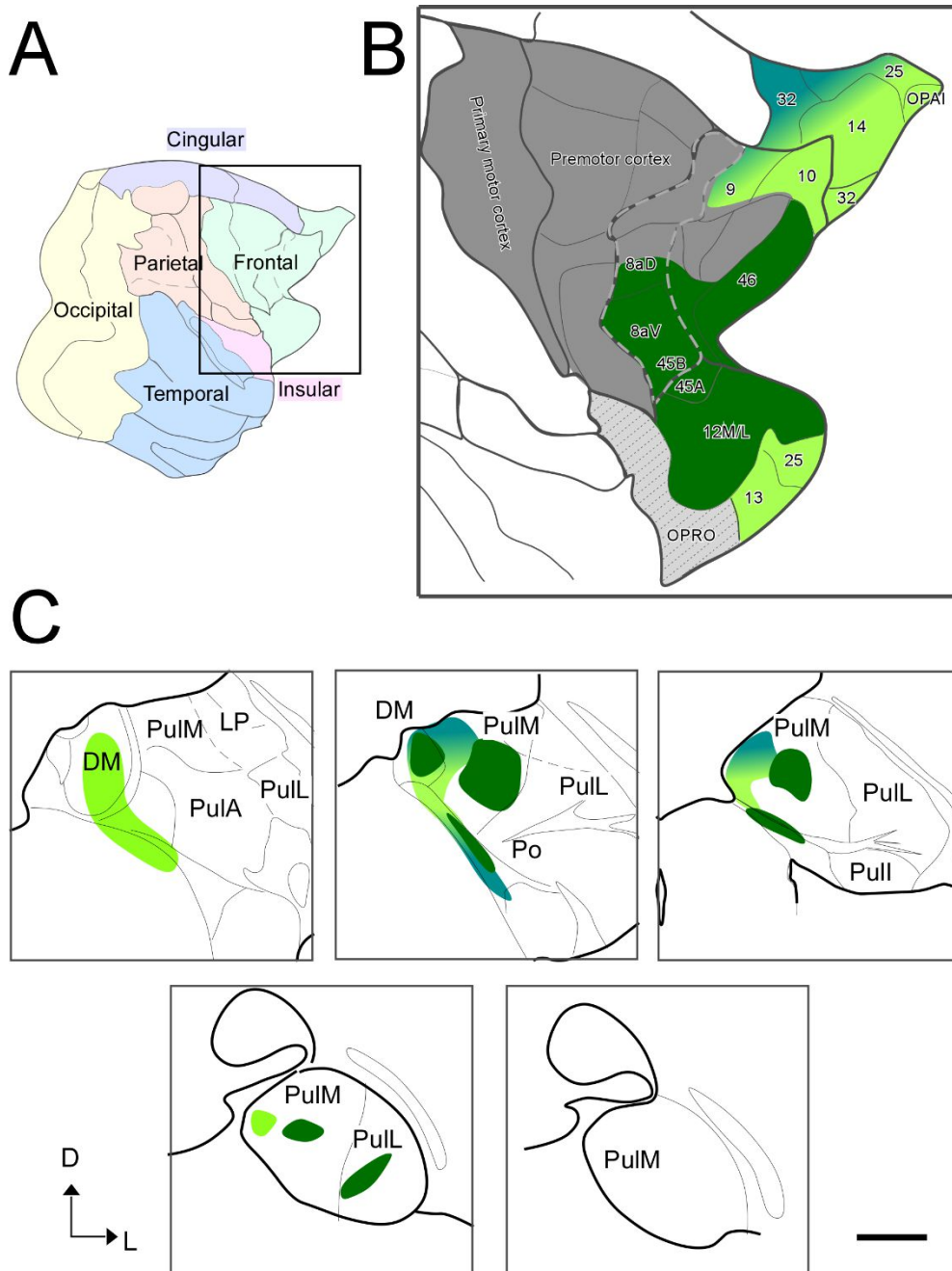
#### *(ii) Aferencias a corteza prefrontal lateral*

En macacos, la región lateral de la corteza prefrontal (PFL) está compuesta por dos distritos corticales diferenciados arquitectónicamente y funcionalmente; la porción dorsal que se inicia en las áreas localizadas en el banco superior del surco principal (área 46 dorsal) y las que quedan superiores a estas en la cara lateral del PFL, y la porción ventral, que se considera a partir de las áreas localizadas en el banco inferior del surco principal (área 46 ventral) y las que quedan por debajo de ellas (Badre y D'Esposito 2009). En tití común, a pesar de no tener el surco principal, se han descrito homologías con las áreas del PFL de macaco en función de criterios conectómicos y de citoarquitectura (Burman et al. 2006).

---

#### **Figura 16. Resumen de la topografía de las proyecciones TC desde PulM y PulL hacia el lóbulo prefrontal en macaco.**

Superior: Reconstrucción bidimensional de la superficie cortical en la que se han representado los gradientes de inervación en corteza prefrontal desde el PulM. Inferior: progresión anteroposterior de cortes coronales del macaco. Tomados de Olszewski 1950. La base bibliográfica de estas representaciones está numerada en la **Tabla 3**, convenciones de la reconstrucción plana de la superficie cortical, cf **Figura 14**.



Mención especial requiere la región opercular frontal (OF), que hemos decidido incluirla en la región lateral de la PFC, ya que gran parte de su extensión se encuentra lateralmente (Gerbella et al. 2016), a diferencia de otros autores que la incluyen como parte de la corteza orbitofrontal (Burman y Rosa 2009). Esta región originalmente fue definida como corteza disgranular por Roberts y Akert (1963) que la designaron como PrCO, y por Barbas y Pandya (1987) como ProM. En el trabajo más moderno de Gerbella et al. 2016, realizado en macaco, se reconoce una región rostral granular (GrFO), seguida por la región disgranular, PrCO o ProM, descrita previamente, ambas regiones presentan además un patrón conectómico muy



diferenciado. En tití común, el trabajo de Burman y Rosa (2009) define en el OF una única área cortical con una “capa granular bien definida” que denominan como PrCO, aunque dado su carácter granular podría ser homóloga al área GrFO definida por Gerbella et al. 2016. Además, en el trabajo de Gerbella et al. (2016) es el único en el que se describen las aferencias subcorticales de la OF, concretamente, describen escasos somas marcados en PulM, sin embargo, no muestran ni describen la localización de dichos somas.

El patrón de inervación a la corteza PFL desde pulvinar es preferentemente a la PFLv en su región caudal. En PFLd también se han descrito proyecciones generalmente en su región ventral caudal. En macacos, se observa un gradiente en PulM, de forma que regiones dorso-laterales proyectan a regiones ventrales del PFLd (Goldman-Rakic y Porrino 1985a; Barbas et al. 1991). Dentro del PFLv, regiones centrales del núcleo proyectan de forma significativa a su región superior. Por último, las proyecciones a regiones inferiores del PFLv, añaden al componente central dentro del núcleo somas desde regiones ventrales del PulM (Asanuma et al. 1985; Goldman-Rakic y Porrino 1985a; Barbas et al. 1991; Romanski et al. 1997).

En el trabajo de Romanski et al. (1997) también se describen resultados contradictorios respecto a las proyecciones a PFLd, estos autores observan aferencias con origen en la esquina medial del PulM caudal a regiones superiores de esta región (área 9). Ningún otro trabajo describe esta proyección.

En tití común se han descrito aferencias a PFL rostral de una región en PulM similar a la descrita en macacos (Brysch et al. 1990). Sin embargo en esta misma especie Roberts et al. (2007), describe que estas proyecciones se originan de la esquina medial caudal del PulM.

En la región anterior del SA de macaco, tras realizar depósitos de HRP en su región ventral, se describió una importante aferencia desde los dos tercios anteriores del PulM, que abarcaban dentro del núcleo una gran región medio-lateral. Los depósitos en el SA que fueron más dorsales resultaron en el marcado de dos bandas de somas en PulM, una banda dorsal y otra ventral (Trojanowski y Jacobson 1974). Dentro del SA otros investigadores se centraron en las aferencias talámicas de los campos oculares frontales (FEF), y de forma consistente se han descrito escasas proyecciones restringidas a la región dorsal del PulM tanto en macaco y como en mono ardilla (Huerta et al. 1987).

#### (b) Proyecciones hacia el lóbulo temporal

Los trabajos en los que se describieron somas marcados en PulM, tras realizar depósitos de trazadores retrógrados en el lóbulo temporal, están enumerados en la **Tabla 4**. Al final de este

apartado, se recoge una síntesis gráfica obtenida a partir de los datos bibliográficos realizados en macaco (**Figura 18**).

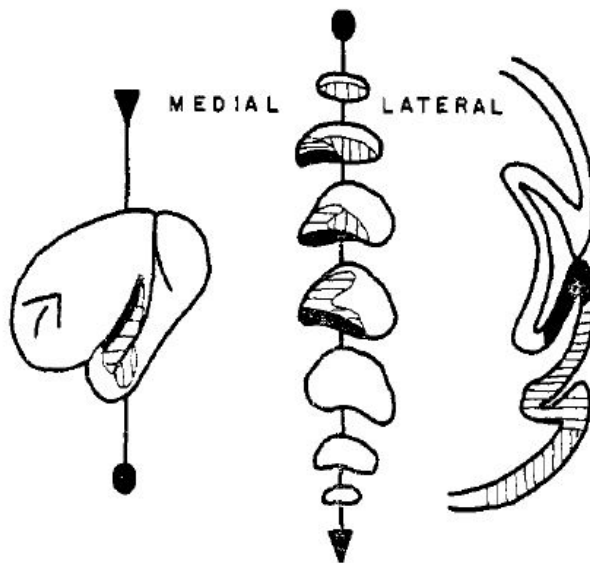
**Tabla 4. Lista con las referencias y otras características de estudios realizados de las conexiones TC en el lóbulo temporal**

En negrita y con asterisco están señalados los trabajos realizados en tití común

REGIÓN CORTICAL	AREA CORTICAL	AUTORES	Animal de experimentación	Técnica
Temporal Superior Parabelt	AURPB	<b>De la Mothe et al. 2012*</b>	<i>C. jacchus</i>	CTb, FR, DY
		Yeterian and Pandya 1989	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
		Heckett et al. 1998	<i>M. mulatta, M. menestrina</i>	FB, DY, FR, FG, FS, RB WGA -HRP
		Trojanowski and Jacobson 1975	<i>Saimiri</i>	AA, HRP
		Kosmal et al.. 1997	<i>M. mulatta</i>	FR, FB y DY
	AUCPB	<b>De la Mothe et al. 2012*</b>	<i>C. jacchus</i>	CTb, FR, DY
		Yeterian and Pandya 1989	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
		Heckett et al. 1998	<i>M. mulatta, M. menestrina</i>	FB, DY, FR, FG, FS, RB WGA -HRP
		Trojanowski and Jacobson 1975	<i>Saimiri</i>	AA, HRP
		Kosmal et al.. 1997	<i>M. mulatta</i>	FR, FB y DY
	STR	<b>De la Mothe et al. 2012*</b>	<i>C. jacchus</i>	CTb, FR, DY
		Yeterian and Pandya 1989	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
		<b>Markowitsch et al. 1985*</b>	<i>M. mulatta, C. jacchus, S. sciureus</i>	HRP
		Kosmal et al.. 1997	<i>M. mulatta</i>	FR, FB y DY
Temporal superior Belt	Anterior	Yeterian and Pandya 1989	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
	Posterior	Yeterian and Pandya 1989	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
	TPI	Yeterian and Pandya 1989	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
Temporal superior sulcus	STP	Cavada et al. 1995	<i>M. nemestrina</i>	FB
	MST	Boussaoud et al. 1992)	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY, WGA, AA
	FST	Boussaoud et al. 1992)	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY, WGA, AA
Temporal inferior	TE1	<b>Markowitsch et al. 1985*</b>	<i>M. mulatta, C. jacchus, S. sciureus</i>	HRP
		Steele and Weller 1993	<i>Saimiri</i>	WGA-HRP, AA, FB
		Baleydier and Morel 1992	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY
		Yeterian and Pandya 1989	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
	TE2	Steele and Weller 1993	<i>Saimiri</i>	WGA-HRP, AA, FB
		Baleydier and Morel 1992	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY
	TE3	Steele and Weller 1993	<i>Saimiri</i>	WGA-HRP, AA, FB
		Baleydier and Morel 1992	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY
		Baizer et al. 1993	<i>M. mulatta</i>	FB, NY, AA, WGA-HRP
		<b>Brysch et al. 1990*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
	TEO	Baizer et al. 1993	<i>M. mulatta</i>	FB, NY, AA, WGA-HRP
		Baleydier and Morel 1992	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY
		Steele and Weller 1993	<i>Saimiri</i>	WGA-HRP, AA, FB
		Webster et al. 1993	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, AA
Temporal ventral	Entorrinal	Insausti et al. 1987	<i>M. fascicularis</i>	WGA-HRP

El primer estudio que analizó de forma sistemática y exclusiva, la organización de las proyecciones del PulM a gran parte de la región lateral del lóbulo temporal fue Locke (1960). Anteriormente, otros investigadores solo habían descrito los cambios degenerativos en pulvinar medial en regiones restringidas del lóbulo temporal en la parte posterior del STS (Walker 1938) y en el polo anterior del lóbulo temporal (Chow 1950). Locke realizó una revisión de los casos de Walker y Chow, y junto con datos propios concluyó que el PulM proyecta con una organización

topográfica en los ejes rostrocaudales y mediolaterales de gran parte de la corteza temporal. El gradiente descrito por Locke mantiene que las regiones temporales auditiva, STS e inferior reciben de regiones ventrales, mediales y laterales del PulM respectivamente (Figura 17).



**Figura 17. Representación diagramática de las proyecciones del pulvinar al lóbulo temporal.**

Topografía de las proyecciones de PulM en el lóbulo temporal. Se observa que en el pulvinar se ha producido una rotación rostracaudal de  $180^\circ$  de las proyecciones y mediolateral de  $90^\circ$ .

*(i) Aferencias al giro temporal superior*

Posteriormente, con técnicas de trazado retrógrado, se han descrito proyecciones desde PulM a las regiones asociativas unimodales (“belt y parabelt”) que rodean a la corteza auditiva primaria y que comprenden gran parte de la región lateral del giro temporal superior (GTS) junto con la región caudal de la unión parieto-temporal (Tpt) adyacente. Esta aferencia ha sido ampliamente analizada en macacos (Hackett et al. 1998, 2007), mono ardilla (Trojanowski y Jacobson 1975) y tití común (Brysch et al. 1990; de la Mothe et al. 2006, 2012). El patrón que se observa es que aumenta el número de somas marcados en la región ventral del PulM al hacer depósitos cada vez más caudales en el GTS (en Tpt Hackett et al. 1998 detectó mayor innervación desde PulM).

En tití común, solo se describieron aferencias significativas para las regiones caudales del belt medial (parte del belt que queda dentro del surco lateral) localizadas ventro-medialmente en PulM (de la Mothe et al. 2006). En la región lateral del parabelt (localizado en la superficie lateral del GTS) se observa mayor presencia de somas marcados en pulvinar, que se distribuyen de forma dispersa en su tercio medial tanto en sus regiones rostrales como caudales (de la Mothe et al. 2012).



De forma llamativa, en mono ardilla el patrón en la región lateral del GTS es diferente, no se observan proyecciones en PulM con depósitos caudales, cuyo foco de somas marcados pasa a localizarse en PulL y Pull. En regiones rostrales y mediales del GTS se observan aferencias desde regiones mediales y ventrales del PulM (Trojanowski y Jacobson 1975).

*(ii) Aferencias del surco temporal superior*

En el trabajo de Yeterian y Pandya (1989) hacen un estudio sistemático en macaco de gran parte del STS. A lo largo del STS se observa el mismo gradiente medio lateral en PulM que el observado en el GTS, de forma que, regiones rostrales en corteza reciben inervación de somas localizados en regiones mediales del PulM y conforme se avanza a regiones caudales en corteza, los somas se localizan en regiones ventrales del PulM. La diferencia entre las regiones dorsales y ventrales del STS es que las proyecciones se encuentran centrales o ventrales en la región medial del PulM respectivamente. Este patrón se ha confirmado en otros estudios, donde tras realizar un depósito en la región medial del STS se observa somas marcados en la región ventral del tercio central del núcleo (Cavada et al. 1995).

El área MT y sus satélites localizados en la región más caudal del STS, tienen una función visual específica (áreas de terminación de la corriente dorsal), y presentan un patrón de inervación desde el complejo pulvinar completamente diferente al resto de áreas que componen el STS. Las proyecciones desde el pulvinar al área MT se encuentran restringidas al componente medial del pulvinar inferior (Benevento y Rezak 1976a; Standage y Benevento 1983). En cambio, parte de la inervación del pulvinar a los satélites del MT (MST y FST) proviene del PulM, localizándose los somas en niveles A-P caudales en la región lateral del núcleo y en niveles rostrales del PulM, los somas quedan en la mitad ventral del núcleo (Boussaoud et al. 1992). La región de somas marcados tras realizar depósitos en estas regiones corticales solapan parcialmente en PulM con la porción del núcleo que están conectada con la corteza temporal inferior (Webster et al. 1991)

*(iii) Aferencias a la región temporopolar*

La inervación de la región polar del lóbulo temporal fue estudiada de forma comparativa en macacos, mono ardilla y tití común por Markowitsch et al. (1985). Estos autores describieron que los somas que inervan esta región se encuentran en niveles caudales del PulM en su porción medial y además, constituye la principal fuente de aferencias talámicas a esta región cortical en todas las especies analizadas. En trabajos posteriores realizados en macaco se confirmaron las descripciones realizadas por Markowitsch et al. (1985) (Morán et al. 1987; Yeterian y Pandya 1989).

*(iv) Aferencias a la corteza temporal inferior y ventral*

Finalmente, describiremos los estudios que se han realizado en la corteza temporal inferior (TI) que contiene las áreas TE1, TE2, TE3 y TEO, y la corteza temporal ventral, cortezas perirrinales y parahipocampales. En macaco, las aferencias talámicas desde el complejo pulvinar a la corteza inferotemporal (IT), presentan un gradiente mediolateral dentro del núcleo muy pronunciado. Se ha descrito que las aferencias del PulM hacia regiones caudales de IT, (cercanas a las áreas de la corteza occipital) proceden de los núcleos PulL y Pull, conforme se progresa a regiones más rostrales en IT el origen de las proyecciones se desplaza hacia el PulM, llegando a ser la región de inervación exclusiva de la región más polar del lóbulo temporal (Baleydier y Morel 1992; Weller y Steele 1992; Webster et al. 1993).

En primates de nuevo mundo, los estudios de las aferencias subcorticales del IT sólo han sido analizadas en mono ardilla. En esta especie, se describe un patrón ligeramente diferente, conformando agrupaciones de somas marcados en PulM cuando se realizaban depósitos en IT rostral. El gradiente de las proyecciones hacia IT en PulM era el siguiente; los somas dentro del núcleo se localizaban en una región central en niveles rostrales y progresaban a una región ventro-medial conforme se avanzaba caudalmente dentro del núcleo. Los depósitos más caudales en corteza presentaron marcado principalmente en PulL dorsal y Pull ventral (Steele y Weller 1993).

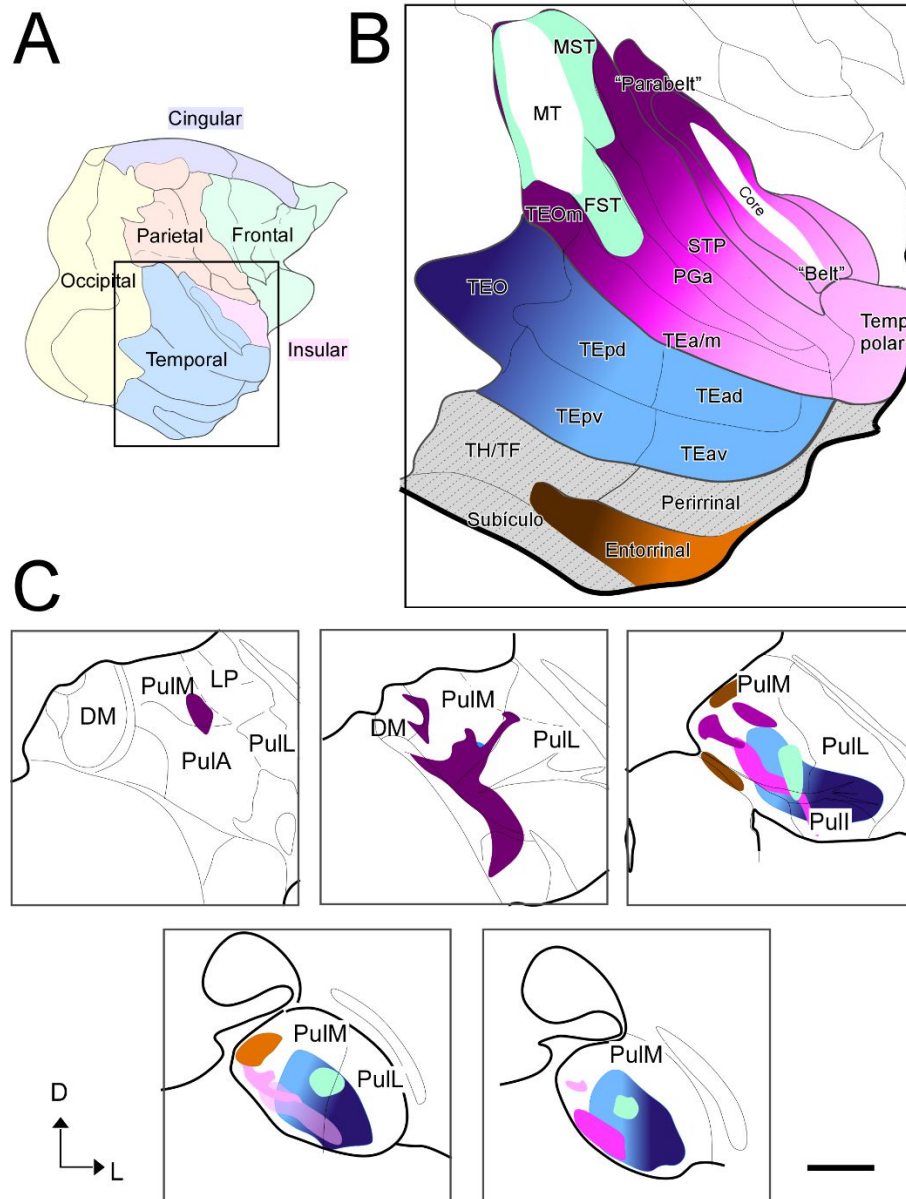
Respecto a las regiones mesiales del lóbulo temporal, sólo se ha realizado un estudio con trazado retrógrado en corteza entorrinal de macaco. Se describe que las proyecciones en corteza entorrinal rostral y medial provienen de regiones dorsales y mediales de niveles caudales de pulvinar medial. En cambio, para inervar la corteza entorrinal caudal los somas se localizan en una banda dorsal del PulM (Insausti et al. 1987).

En la **Figura 18**, se recoge una representación gráfica de los gradientes de las proyecciones TC en pulvinar y la corteza del lóbulo temporal realizada con los datos obtenidos en macaco.

---

**Figura 18. Resumen de la topografía de las proyecciones TC desde PulM y PulL hacia el lóbulo temporal en macaco.**

Superior: Reconstrucción bidimensional en la que se han representado los gradientes de inervación con origen en los componentes del pulvinar. Inferior: progresión anteroposterior de cortes coronales del macaco. Tomados de Olszewski 1950. La base bibliográfica de estas representaciones está numerada en la **Tabla 4**, convenciones de la reconstrucción bidimensional de la superficie cortical, cf **Figura 14**.



(c) Proyecciones hacia el lóbulo parietal y a cortezas cingular e insular

Las distintas regiones de la corteza somatosensorial primaria (áreas 3a, 3b y 1/2) no reciben aferencias desde el PulM (Darian-Smith et al. 1990). En macacos, la región posterior del lóbulo parietal, recibe mayor inervación desde el PulM en regiones inferiores (áreas PF, PFG, PG y OPT) y en las áreas homólogas del SIP (LIP, AIP, VIP y MIP), con proyecciones de menor densidad desde los núcleos Po, PulL y LP. En la región superior de la corteza parietal posterior (PE y PEc), este patrón se invierte de forma que las proyecciones a esta área están dominadas por los núcleos PulA, PulL y PL, con menor contribución del PulM (Schmahmann y Pandya 1990). En la **Tabla 5** se recogen las referencias bibliográficas utilizadas en este análisis, y en la **Figura 19** la síntesis gráfica obtenida de las proyecciones del PulM hacia el lóbulo parietal.

(i) *Aferencias de la superficie lateral de la corteza parietal posterior (incluido el surco intraparietal)*

En regiones más rostrales del IPP, el área PFG recibe invasión del tercio medial del PulM (Kasdon y Jacobson 1978) En V6A dorsal y ventral, un estudio demostró gran cantidad de proyecciones desde PulM, en sus dos tercios laterales en macaco (Gamberini et al. 2015).

**Tabla 5. Referencias bibliográficas de conexiones TC con el lóbulo parietal y cortezas cingular e insular**  
En negrita y con asterisco están señalados los trabajos realizados en tití común

REGIÓN CORTICAL	AREA CORTICAL	AUTORES	Animal de experimentación	Técnica
Parietal Posterior superior	PE	<b>Brysch et al. 1990*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Padberg and Krubitzer	<i>Callicebus moloch</i>	FR, FE
	PEc	<b>Brysch et al. 1990*</b>	<i>C. jacchus</i>	WGA-HRP
		Gamberini et al. 2009	<i>M. fascicularis</i>	CTB, DY, FB
		Schmahmann y Pandya 1990	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
		Buckwalter et al. 2008	<i>M. fascicularis</i> , <i>M. mulatta</i>	FB
Regiones homólogas del surco intraparietal	LIP	Asanuma et al. 1985	<i>M. fascicularis</i>	AA, NY, FB, TB
		Baizer et al. 1993	<i>M. mulatta</i>	FB, NY, AA, WGA-HRP
		Baleydier and Morel 1992	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY
		Baleydier and Mauguière	<i>M. fascicularis</i>	HRP
	VIP	Baizer et al. 1993	<i>M. mulatta</i>	FB, NY, AA, WGA-HRP
	AIP	Baleydier and Morel 1992	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY
Parietal mesial	PGM(7m)	Padberg and Krubitzer	<i>Callicebus moloch</i>	FR, FE
		Baleydier and Morel 1992	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY
		Leichnetz 2001	<i>M. fascicularis</i> , <i>C. apella</i>	HRP
		Buckwalter et al. 2008	<i>M. fascicularis</i> , <i>M. mulatta</i>	FB
	31	Buckwalter et al. 2008	<i>M. fascicularis</i> , <i>M. mulatta</i>	FB
Parietal Posterior inferior	PF	Schmahmann y Pandya 1990	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
	PFG	Schmahmann y Pandya 1990	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
		Kasdon y Jacobson 1978	<i>M. mulatta</i>	HRP
	OPt	Schmahmann y Pandya 1990	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
		Kasdon y Jacobson 1978	<i>M. mulatta</i>	HRP
	PG (7a)	Schmahmann y Pandya 1990	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
		Asanuma et al. 1985	<i>M. fascicularis</i>	AA, NY, FB, TB
		Baleydier and Morel 1992	<i>M. fascicularis</i>	FB, DY
		Cavada et al. 1995	<i>M. nemestrina</i>	DY
		Yeterian and Pandya 1989	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP
		Kasdon y Jacobson 1978	<i>M. mulatta</i>	HRP
		Kasdon and Jacobson 1978	<i>M. mulatta</i>	HRP
Cingular anterior	A24	Romanski et al. 1997	<i>M. mulatta</i>	WGA-HRP, FB, DY y AA
Cingular posterior	A30	Shibata and Yukie 2003	<i>M. fuscata</i>	CTb, FB, DY y BDA (ant)
		Buckwalter et al. 2008	<i>M. fascicularis</i> , <i>M. mulatta</i>	FB
		Shibata and Yukie 2003	<i>M. fuscata</i>	CTb, FB, DY y BDA (ant)
	A23a-c	Buckwalter et al. 2008	<i>M. fascicularis</i> , <i>M. mulatta</i>	FB
		Shibata and Yukie 2003	<i>M. fuscata</i>	CTb, FB, DY y BDA (ant)
Insula anterior	AI, Dlr, Glr	Mufson and Mesulam 1984	<i>M. mulatta</i>	HRP, HRP-WGA, AA
Insula Posterior	Rel, Glc, Dic	Mufson and Mesulam 1984	<i>M. mulatta</i>	HRP, HRP-WGA, AA
	IPro	Jezzini et al. 2015	<i>M. mulatta</i>	FB, LY, CTB-594/488

En IPP caudal (áreas PG y OPt), los somas que invierten PG se localizan dorsalmente en el núcleo (Kasdon y Jacobson 1978; Cavada et al. 1995). En el trabajo de Baleydier y Mauguière (1987) se realizaron dos depósitos en PG uno rostral y otro caudal en el mismo animal, en PulM las proyecciones hacia ambas zonas se distribuyen a lo largo de los dos tercios posteriores del

núcleo, en su mitad dorsal. Las proyecciones desde PulM a la región caudal de PG, presentan mayor densidad que las proyecciones que se dirigen a PG rostral. Algunos autores han descrito una ordenación de las aferencias de PulM hacia el área PG en forma de discos alargados que se disponían de forma horizontal en la mitad lateral del núcleo (Asanuma et al. 1985). Cuando se compara la localización en PulM de los somas que proyectan al área PG y los que proyectan a SIP, se aprecia que en niveles rostrales del PulM, las aferencias hacia LIP se localizan mediales a las de PG, caudalmente en PulM este patrón se invierte de forma que las proyecciones hacia PG se localizan mediales y a SIP laterales (Baleydier y Morel 1992).

En primates del nuevo mundo, las regiones laterales y centrales en PulM junto con amplias regiones del LP proyectan a zonas en corteza parietal que participan en la realización del movimiento manual de alcanzar y agarrar un objeto y también, con la adición del PulA, en el comportamiento de defensa (Gharbawie et al. 2010).

Dentro del SIP, áreas VIP y LIP, las aferencias desde PulM en macaco provienen de su región central-lateral en los dos tercios posteriores del núcleo (Schmahmann y Pandya 1990; Baizer et al. 1993).

*(ii) Aferencias a la cara medial de la corteza parietal posterior*

En la región mesial de la corteza parietal posterior (PGM y 31), se ha observado limitada innervación desde regiones ventrales del PulM, sin embargo el grueso de las proyecciones provenían del PulL y LP (Leichnetz 2001a; Buckwalter et al. 2008), en el trabajo de Schmahmann y Pandya (1990) se describe el componente ventral aunque se incluye como parte del núcleo posterior (PO) y además observan una región dorsal en PulM cerca del límite con PulL que inerva en esta región cortical. El área 7m podría contener el campo ocular parietal que podría ser parte de una red neural involucrada en la coordinación de movimientos manuales para el alcance de objetos con guía visual (Anderson et al. 1990; Thier and Andersen 1998), esta área es importante para la coordinación de movimientos de la mano bajo control ocular.

*(iii) Aferencias a la corteza cingular*

En macaco, las proyecciones del PulM hacia la corteza cingular posterior (diferentes subdivisiones del área 23), se encuentran formando una banda horizontal dorsal en los dos tercios posteriores del núcleo (Baleydier y Mauguière 1987) que cambia en niveles rostrales a una localización central y lateral. En otros trabajos con depósitos más restringidos en regiones caudales del área 23b, se presentan diferencias respecto a si se dirigen a la región dorsal o ventral de esta región cortical. Las aferencias del PulM a la región cingular dorsal son menos pronunciadas y se organizan, dentro del núcleo, formando una banda horizontal en los dos

tercios laterales en niveles A-P intermedios del PulM. En cambio, las proyecciones hacia regiones cingulares ventrales, se encuentran también en una localización dorsal, aunque en los dos tercios mediales del núcleo. En los depósitos que realizaron en el área 29 no se apreciaron somas marcados en PulM (Shibata y Yukie 2003; Buckwalter et al. 2008). Las aferencias desde PulM que están dirigidas al área 23c tienen dos bandas, una ventral cerca al límite con el Li, y otra dorsal en la mitad lateral del núcleo (Buckwalter et al. 2008).

### *(iv) Aferencias a la corteza insular*

Las aferencias desde el PulM a la corteza insular, han sido analizadas muy parcialmente en macaco. La región rostral de la ínsula recibe aferencias escasas de la región central del PulM (Mufson y Mesulam 1984b; Jezzini et al. 2015). Por el contrario, en regiones caudales de la ínsula, los orígenes de las proyecciones son más numerosas y se quedan en la mitad ventral del PulM (Mufson y Mesulam 1984b).

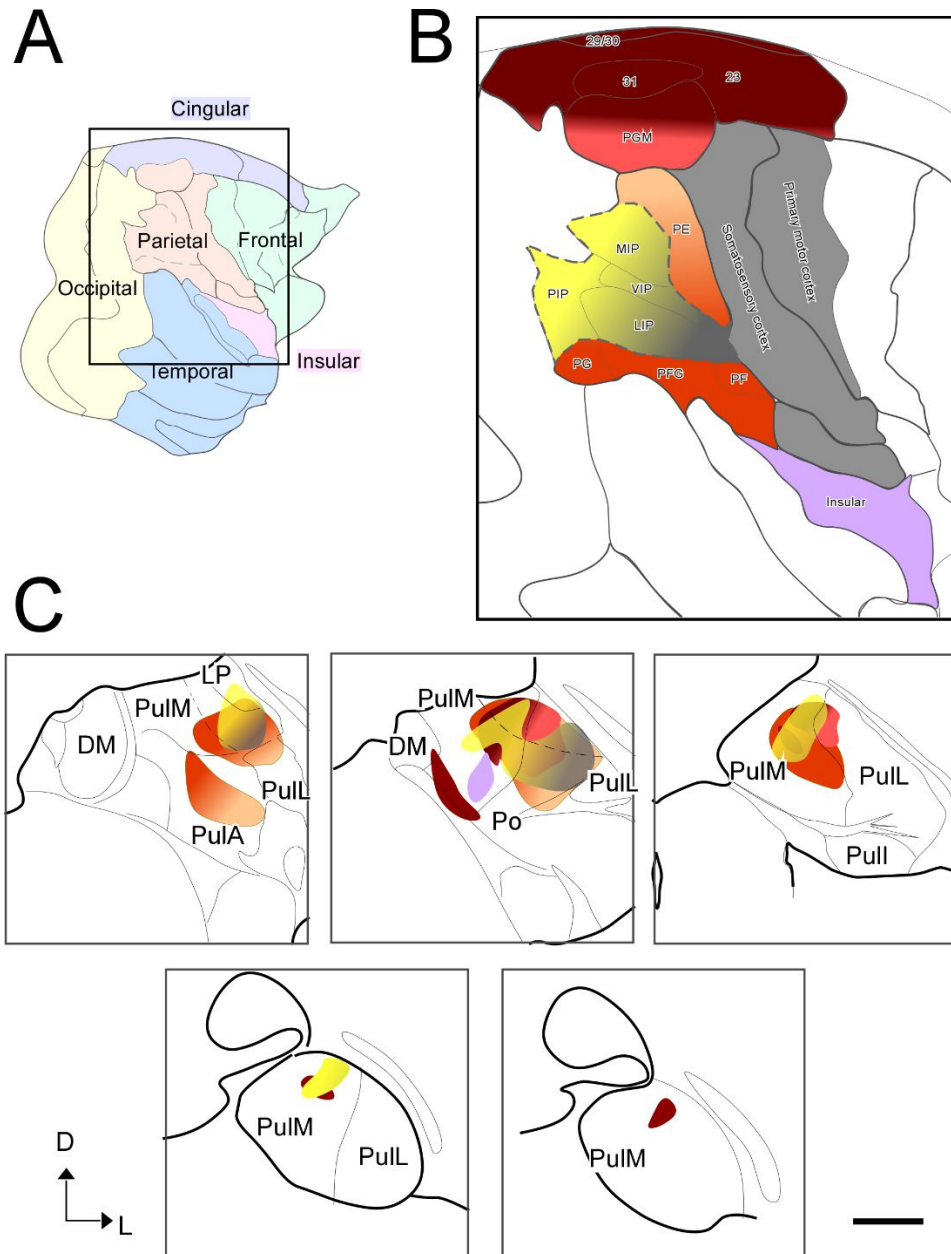
En conclusión, las conexiones corticales del PulM parecen sugerir la existencia de subregiones implicadas exclusivamente en procesamiento visual de alto nivel, mientras que otras subregiones podrían estar dominadas por otras modalidades de sensación (auditiva y somatosensorial) o podrían participar, en redes corticales ampliamente distribuidas que integran información de varias modalidades sensoriales.

### (3) Estudios de doble marcado de trazadores retrógrados en pulvinar medial

Dada la diversidad y el solapamiento de los focos de proyección hacia múltiples áreas corticales con origen en el núcleo PulM, diversos autores han planteado la posibilidad de que una misma neurona pueda proyectar a áreas distintas. Para ello realizaron depósitos de trazadores axonales retrógrados en distintas áreas corticales del mismo animal para analizar la presencia de neuronas doblemente marcadas en PulM. Se observó que las neuronas marcadas retrógradamente se solapaban en las mismas regiones del PulM tras depósitos localizados en las cortezas parietal posterior, cingular posterior (Baleydier y Mauguière 1987), y tras depósitos situados en la corteza parietal posterior y la corteza PFC (Asanuma et al. 1985; Gutierrez et al. 2000). Sin embargo, a pesar de presentar gran solapamiento no observaron neuronas doblemente marcadas.

La relación entre las poblaciones que proyectan al área 7 y las que inervan la corteza cingular posterior fue analizada por Baleydier y Mauguiere et al. 1987. Como control positivo realizaron depósitos en regiones corticales acopladas funcionalmente y observaron un extenso doble marcado de estas poblaciones. En cambio, las proyecciones hacia las cortezas parietales y

cingulares estaban segregadas. Una población tenía una posición dorsal (área 7) y la otra población (área 23) estaba ventral a las proyecciones hacia área 7. Al estar segregadas no se encontró ninguna neurona doblemente marcada en PulM.



**Figura 19. Resumen de la topografía de las proyecciones TC desde PulM y PulL hacia el lóbulo temporal en macaco.** Superior: reconstrucción bidimensional en la que se han representado los gradientes de inervación con origen en los componentes del pulvinar. Inferior: progresión anteroposterior de cortes coronales del macaco. Tomados de Olszewski 1950. La base bibliográfica de estas representaciones está numerada en la **Tabla 5**, convenciones de ña reconstrucción bidimensional de corteza, cf **Figura 14**.

Asanuma et al. 1985, describió que las proyecciones hacia la corteza parietal se organizan formando bandas con forma de disco que se orientan de forma dorsomedial a ventrolateral y se



extienden en gran parte del extremo caudal del núcleo, las neuronas localizadas rostralmente en PulM inervan regiones rostrales del área 7a y de forma inversa, las neuronas localizadas caudalmente inervan regiones caudales del área 7a. Dentro de las bandas de somas, las células que se localizan medialmente proyectan a regiones laterales de 7a, y los somas que se localizaba en la región lateral proyectaban a la región medial del campo cortical. La proyección a corteza prefrontal también adquiere forma de banda con orientación similar a los de parietal. Estas dos poblaciones de neuronas del PulM que inervan regiones distantes corticales (regiones de la PFC y parietales) ocupan zonas de solapamiento parcial, de forma que hay áreas libres entre los agregados neuronales con forma de disco. En las zonas de solapamiento no se encontraron neuronas dobles, de modo que las dos poblaciones de somas de proyección cortical son esencialmente distintas. La localización de las poblaciones de somas que proyectan a las cortezas inferior parietal y prefrontal dorsolateral obtenidas en el trabajo de Gutierrez et al. (2000) es diferente a lo descrito por Asanuma et al. (1985). El solapamiento de los somas marcados se produce en la región dorsal del núcleo y no es muy extenso.

Finalmente, la combinación las regiones inferiores de las cortezas parietal y temporal ha sido analizada en macacos. Se observó una casi completa segregación de las dos poblaciones de somas marcados en el pulvinar, con una pequeña región de solapamiento en PulM cerca del borde con el Pull. Estos resultados demuestran una clara separación entre los aferentes talámicos de la corteza inferior parietal y el inferotemporal lo que refleja la separación de las aferentes del área preestriada a estos dos territorios corticales (Morel y Bullier 1990).

De esta forma, podemos observar que se han realizado escasos estudios que aborden la posibilidad de que una neurona inerve simultáneamente dos áreas corticales. Por una parte, es un abordaje con una gran dificultad metodológica ya que requiere una gran precisión al realizar depósitos que solapen en tálamo, y por otra, es una cuestión que requiere del análisis de más áreas corticales y en otras especies aparte del macaco.

### 1.3. Principios de la comunicación entre pulvinar y corteza

Como se describió en el apartado anterior, el pulvinar tiene una representación de gran parte de la corteza, sin embargo, no es una organización estrictamente topográfica ya que las regiones de distintas áreas corticales que están comunicadas córtico-corticalmente entre sí, se encuentran solapadas, lo que permite la comunicación transcortical indirecta vía pulvinar. Por ello, este complejo no debe ser considerado como un mero sitio de relevo de la información, si no como un coordinador entre áreas que se encuentran interconectadas (Shipp 2003).



De esta forma, el complejo pulvinar actúa para coordinar el procesamiento de la información cortical facilitando y manteniendo la formación de ensamblajes sincronizados entre regiones corticales. En los estudios de Saalman et al. (2013), en macaco, se observó que el complejo pulvinar modulaba la sincronización en varias áreas corticales para facilitar la transmisión de la información importante para el mantenimiento de la atención.

Otro aspecto importante es que las conexiones del pulvinar tanto TC como corticopulvinares no son uniformes funcionalmente. Rockland et al. (1999, 2002) describió dos tipos de axones corticopulvinares, los tipos E y R, en función de las diferencias anatómicas. Los axones tipo E (elongados) son más numerosos, tienen campos terminales elongados y un largo número de especializaciones terminales que son distintivamente espinosas. Los axones tipo R (redondos) están en poco número con árboles terminales esféricos y pequeños cuyas terminaciones son grandes y redondeadas.

Estos dos tipos de terminaciones han sido demostrados en las vías corticotalámicas de las cortezas auditivas (Ojima 1994) y visuales (Rouiller y Welker 2000). Se puede sugerir que las conexiones de tipo R ejercen una influencia de tipo “driver”, mientras que las conexiones de tipo E son más moduladoras (Sherman y Guillery 2011).

En cuanto a los axones TC, los análisis de los terminales marcados anterógradamente tras depósitos de BDA en el núcleo pulvinar lateral muestran que los focos de proyección a las áreas extraestriadas (V2, V3 y V4) tienen más densidad en capas III y V como se describía en trabajos previos (Levitt et al. 1995), pero la reconstrucción de axones individuales demostró que tienen terminaciones en diferentes combinaciones laminares. En el área V2 los axones tienen terminaciones con combinaciones laminares distintas con colaterales en capa I además de las terminaciones en capas III, IV y V. De esta forma en V2 las terminaciones TC se encuentran en capas que son dianas tanto de conexiones *feedforward* como *feedback*. El patrón de las conexiones desde el complejo pulvinar a V1 son distintas, siendo la proyección más densa en capa I y menos densa en capa II-III (Ogren y Hendrickson 1979b). En cuanto los axones entran en la capa I giran en ángulos rectos y proyectan en paralelo a la superficie cortical de la parte externa de dicha capa dejando botones *en passant*. Estas diferencias en los patrones de distribución radial hacen que sea difícil clasificar las proyecciones TC entre conexiones directrices o moduladoras. Las proyecciones desde PL a V2 que terminan en capa IV se consideran de tipo directriz mientras que las terminaciones más pequeñas en capa I podrían ser de tipo modulador (Marion et al. 2013).

Las aferencias desde el complejo pulvinar a V1 parecen ser moduladoras debido a que terminan principalmente en capa I. En el trabajo de Marion et al. 2013 se analizan estas conexiones y demuestran que en base a su menor tamaño de varicosidades las proyecciones TC en V1 tienen un efecto modulador respecto al efecto que ejercen en V2 donde el tamaño de los botones es mayor.

Sin embargo, no por ser aferencias moduladoras tienen menor importancia en el sistema, estudios electrofisiológicos, han demostrado que las aferencias moduladoras en v1 desde el complejo pulvinar tienen un poderoso efecto en los campos receptivos de sus células. Se observó que después del bloqueo reversible de las proyecciones desde el núcleo pulvinar lateral, la actividad visualmente dirigida de las neuronas corticales en V1 que tenían la misma representación del campo visual que la zona de pulvinar inhibida disminuía notablemente, esto convierte a este complejo en un elemento clave en el control de las respuestas visuales de la corteza estriada (Purushothaman et al. 2012).

## 1.4. Papel funcional del complejo pulvinar en los circuitos transtalámicos

### *1.4.1. Papel del complejo pulvinar en las corrientes dorsal y ventral del procesamiento visual.*

El procesamiento de la información visual, ha sido separado en dos corrientes o vías visuales que implican la interacción de conjuntos específicos de áreas corticales. De esta forma, se han descrito áreas corticales implicadas en el procesamiento de la identidad de objetos, cuyas etapas finales se encuentran en la corteza inferotemporal, respecto a otras áreas involucradas en la localización y movimiento del estímulo visual, integración que se consigue en regiones de la corteza parietal posterior (Ungerleider y Haxby 1994). Además, ambas corrientes constituyen la base de funciones cognitivas mas complejas; la corriente ventral media la transformación de los contenidos de la imagen visual en una representación detallada que guía la memoria y el reconocimiento visual, y la corriente visual dorsal, media la guía visual de la acción, principalmente en tiempo presente (Milner 2017). Ambas corrientes de procesamiento, se encuentran fuertemente interconectadas cortico-corticalmente, lo que permite la integración entre los dos sistemas, de forma que, el individuo obtiene una presentación unitaria de la realidad visual (Goodale 1998).

La región dorsal del PulL (PLd y PMI de la división de Gutierrez et al. 2000) y las subdivisiones del Pull junto con la región ventral del Pull, han sido implicadas en el procesamiento de la información visual; debido a que poseen campos retinotópicos y por su extensa conectividad con el lóbulo occipital (revisado en Stepniewska 2003 y en los apartados de

conectividad de la introducción). Sin embargo, cada región conecta con múltiples pero diferentes conjuntos de áreas visuales, lo que podría ser el reflejo de la implicación diferencial de cada región del complejo pulvinar con la ruta cortical dorsal o ventral respectivamente. Además, los campos retinotópicos de estas regiones del complejo pulvinar, parecen estar mejor adaptadas a una u otra corriente de procesamiento visual. Así, los campos retinotópicos localizados en el Pull y PulL ventral presentan mayor representación foveal (Gattass et al. 1978), y en cambio, el PulL dorsal presenta un campo retinotópico con mayor representación de la periferia (Petersen et al. 1985b). Esta teoría ha sido analizada experimentalmente en el trabajo de Gutierrez et al. 2000 y revisada por Kaas y Lyon 2007.

De estos trabajos, se extrae que la región dorsal del Pull y PulM, en base a su conectividad con la corteza parietal inferior, se relaciona con la corriente visual dorsal, participando en la localización del estímulo visual y otras funciones visuoespaciales. No obstante, tanto el Pull como el PulM tienen conexiones bien establecidas con la corteza inferotemporal (Webster et al. 1991). En consecuencia, dentro de estos componentes se podría estar realizando la integración de ambas corrientes del procesamiento visual. Sin embargo, experimentalmente, por medio de la aplicación simultánea de trazadores retrógrados en las cortezas parietal posterior y temporal inferior, se observó que los somas que producen la innervación hacia ambas regiones corticales ocupan territorios segregados del PulM, por lo que la información de ambas corrientes no llega a mezclarse (Bender y Baizer 1990; Baleyrier y Morel 1992; Gutierrez et al. 2000).

Dentro del Pull, también se ha estudiado la posible integración de ambas vías. Ya que el Pull presenta conexiones con componentes corticales de la vía ventral, áreas V2, V4 y TEO (Casagrande 1994; Van Essen y Gallant 1994) y de la vía dorsal, concretamente de las áreas corticales MT y sus satélites involucradas en la detección del movimiento (Ungerleider et al. 1984; Boussaoud et al. 1992). Sin embargo, la conectividad de estas vías se encuentra segregada en las subdivisiones del Pull. Así, las subdivisiones PullcL y PullvL innervan las regiones corticales de la vía ventral y la innervación de MT es llevada a cabo por la subdivisión Pullm.

#### *1.4.2. Maduración del área MT.*

El desarrollo de las relaciones jerárquicas que se establecen durante el procesamiento de la información visual en las cortezas visuales del primate, no se encuentra finalizado del todo en el momento del nacimiento, lo que implica una maduración posterior durante los primeros meses de vida del individuo. Sin embargo, el desarrollo de las cortezas visuales no se realiza de forma jerárquica, con las más primarias al principio, si no que el área MT se desarrolla antes que otras cortezas visuales. Así, se sugiere que el MT podría estar actuando como un área primaria

que junto con V1 dirige tempranamente el desarrollo de las corrientes visuales (Bourne et al. 2007). Este punto de vista es especulativo, puesto que pocos estudios se han centrado en el desarrollo diferencial de las vías directas e indirectas que proyectan la información visual hacia el área MT. La maduración de MT, por tanto, no puede ser llevada a cabo por V1 que todavía no ha terminado de madurar, si no que lo hace gracias a que recibe aferencias primarias retinianas por medio del Pulm y del GL (Bourne et al. 2007; Warner et al. 2012). Justo después del nacimiento, las aferencias retinopulvinares desde el Plm al área MT son mayores que las proyecciones desde V1, pero disminuyen cuando las proyecciones directas desde V1 se incrementan. Esto sugiere un papel significativo del pulvinar inferior en el desarrollo temprano de la MT.

Otro aspecto derivado de la pronta maduración de MT es que en casos de lesiones neonatales de V1, la ruta entre Pulm y MT no degenera. Esto, junto con las conexiones del GL, permite que las aferencias desde retina sigan llegando a MT, de modo que en el individuo adulto hay cierta preservación de la visión a pesar de no tener V1 (Kaas 2015; Warner et al. 2015; Bourne y Morrone 2017).

#### *1.4.3. Atención visual.*

Debido a que los recursos que puede usar el sistema visual son limitados, es imposible que haya un procesamiento simultáneo de toda la información visual del mundo que nos rodea. La atención selectiva, permite superar esta limitación además de ofrecer al sistema un funcionamiento más eficiente. El complejo pulvinar, parece estar involucrado en esta función, ya que, las lesiones unilaterales, tanto en humanos como en primates no humanos, producen un síndrome de negligencia unilateral con déficits en el comportamiento visuomotor y en la atención en la región del campo contralateral a la lesión (Ward y Arend 2007). Además, las respuestas visuales de neuronas únicas a lo largo del complejo pulvinar del macaco son favorecidas o atenuadas dependiendo de la relevancia y la consciencia perceptual del estímulo visual (Wilke et al. 2009). En humanos, también se ha observado, por medio de RMf, que el consumo de glucosa en el pulvinar se incrementa por la atención selectiva (Kastner y Pinsk 2004). Por último, es reseñable que elementos anatómicos primordiales en la red neuronal de la atención, como las cortezas prefrontal y parietal posterior, están altamente conectados con el PulM (ver apartado conectividad).

Los estudios con registros neuronales simultáneos, sugieren que la transmisión selectiva de la información, depende del grado de sincronización entre los grupos neuronales en diferentes áreas corticales. Sin embargo, el mecanismo por el que se consigue esta sincronización

no está del todo claro. Un excelente candidato para modular la sincronización es el tálamo, ya que, dada su fuerte conectividad con corteza, se encuentra en una posición privilegiada para regular la transmisión córtico-cortical, en base a demandas atencionales o cognitivas por medio de la sincronización cortical (Saalmann y Kastner 2009, 2011).

En el trabajo de Saalmann et al. 2012, analizaron en macacos, por medio de registro electrofisiológico, si la región ventral del complejo pulvinar (región retinotópica) regulaba la sincronización entre las áreas corticales visuales V4 y TEO, en el contexto de la atención visual. Observaron que cuando el estímulo se localizaba en la región del campo visual donde el mono había sido instruido para atender, las neuronas en cuyo campo receptivo estaba el estímulo presentaban un robusto aumento de su activación. Este aumento, se mantenía durante un tiempo de espera (memoria de trabajo), de modo que, al volverse a presentar el estímulo en ese mismo campo, las neuronas presentaban significativamente mayor activación. Además, se producía la sincronización entre PulL y corteza, que se evidenciaba en un aumento de la coherencia en la banda del EEG alfa, tanto cortico-cortical como tálamo-cortical. En consonancia, los potenciales de acción de las neuronas del pulvinar se sincronizaban con la fase de los potenciales de campo corticales. La dirección de la conectividad, inferida con el análisis de la causalidad de Granger, muestra que el pulvinar influencia la actividad oscilatoria tanto en V4 como en TEO, cuando el mono atiende a la localización del RF donde se localiza el estímulo.

En otro estudio, realizaron la inactivación farmacológica del PulL. Describieron electrofisiológicamente, que al inactivarse la región ventral del pulvinar, que proyectaba al área V4, se reducían las respuestas evocadas sensorialmente en esa misma corteza y se producía la disminución de la sincronización en la banda gamma del EEG con un aumento paralelo de la coherencia en las bajas frecuencias (asociadas a la falta de atención y el sueño). Además, tras la inactivación, los monos presentaron dificultades para realizar una tarea visual en la región del campo visual afectada (Zhou et al. 2016). De esta forma, las interacciones corticales con el pulvinar ventro-lateral serían necesarias para el procesamiento del estímulo, así como en el mantenimiento y la modulación de la dinámica neuronal oscilatoria en la corteza visual necesaria para la atención normal.

#### *1.4.4. Reconocimiento de serpientes.*

Se ha propuesto que la ruta visual entre el colículo superior y el complejo pulvinar, podría estar involucrada en la atención visual hacia objetos novedosos e importantes que aparecen repentinamente en el campo visual (Robinson y Petersen 1992). Como estos objetos novedosos pueden ser depredadores, este sistema ha estado involucrado en la detección y evitación de

estos, lo que ha supuesto una importante presión evolutiva. Esta ruta ha sido la base para el desarrollo de la “Teoría de la detección de serpientes”, esta teoría sugiere que regiones específicas del PulM evolucionaron en parte para asistir a los primates en la detección y evitación de las serpientes (Isbell 2009). La base anatómica de esta teoría, es el estudio de Benevento y Standage 1983, que describe aferencias en el PulM que provenían de las capas profundas del CS (involucradas en el comportamiento motor defensivo) y de las proyecciones desde el PulM a la amígdala (Jones 1976). No obstante, ambas conexiones se han descrito de forma escasa y requieren verificación con técnicas modernas.

Las respuestas electrofisiológicas revelan que los humanos también son capaces de detectar serpientes visualmente incluso antes de ser conscientes de ellas (Ohman y Soares 1993). En el trabajo de Van Le et al. 2013, reportan la existencia de neuronas en los núcleos PulM y PulLd de macaco que responden selectivamente a las imágenes visuales de serpientes. Comparado con otras tres categorías de estímulo (cara de monos, manos de monos y figuras geométricas), observaron que la ratio de las neuronas que responden a las serpientes es más grande que las neuronas que responden a las otras categorías, y la media de la magnitud de sus respuestas, es mayor cuando el estímulo es una serpiente respecto a los otros estímulos.

### *1.4.5. Toma de decisiones espaciales. Realización de movimientos de alcance y agarre manual, y de los movimientos oculares sacádicos*

#### (1) Movimientos manuales de alcance y agarre

En el trabajo de Wilke et al. 2010, se intenta discernir el papel del complejo pulvinar en la selección y ejecución de los movimientos de alcance y agarre, bajo guía visual. Realizaron en macacos la inactivación farmacológica del pulvinar dorsal de un hemisferio, y observaron que dicha inactivación producía una constelación de déficits, en la región contralateral a la inactivación, que involucraban la selección apropiada y coordinación de los movimientos de alcance y agarre guiados visualmente. En concreto, los autores observaron que la inactivación del PulM interrumpía los movimientos de alcance y agarre de la mano contralateral. Los monos tendían a errar en la posición de la diana y no colocaban de forma correcta la mano para el acto de agarre. Estos déficits son similares a los que se producen después de lesión de la corteza parietal posterior, incluyendo las áreas 5 y 7 (Lynch 1980; Mesulam 1981; Rizzolatti y Matelli 2003; Vallar 2007). Teniendo en cuenta la conectividad del PulM su inactivación podría llevar a la hipofunción de las células de la corteza parietal posterior que codifican para las relaciones espaciales entre las partes del cuerpo y el espacio egocéntrico (Andersen et al. 1993).

Además, los errores direccionales (no alcanzar adecuadamente un objeto localizado en el campo ocular) en pacientes humanos con ataxia óptica han sido atribuidos a la interrupción de la comunicación fronto-parietal, en los que se encontrarían la zona de localización del campo visual (campos oculares frontales) y la localización de la mano junto con los parámetros de su movimiento “parietal reach región” (Battaglia Mayer et al. 1998; Andersen et al. 2014). De esta forma, la inactivación del PulM llevaría a la desintegración de los procesos de transformación sensorimotora (Wilke et al. 2010).

## (2) Tiempos de reacción y elección de la dirección de las sacadas

Los movimientos oculares sacádicos son importantes para el escaneo de la escena visual y por tanto constituyen un proceso selectivo importante en la percepción visual (Liversedge y Findlay 2000). Las sacadas son movimientos voluntarios, rápidos y conjugados de ambos ojos; tienen como objetivo cambiar rápidamente la fijación ocular y traer imágenes de nuevos objetos de interés a la fóvea. En este tipo de movimientos, se encuentran involucradas las áreas de los campos oculares frontal y parietal, regiones de la corteza parietal posterior como el área LIP, el colículo superior (Colby et al. 1996; Trillenberg et al. 2007; Agarwal et al. 2016) y regiones encargadas de los movimientos oculares en el mesencéfalo, como los núcleos motores de los pares craneales (III y IV) y el núcleo intersticial de Cajal entre otros, junto con el núcleo abducens localizado en el puente (revisado en Sparks 2002).

El complejo pulvinar, en base a la conectividad anatómica entre el PulM con las regiones corticales de los campos oculares frontales y la corteza intraparietal, podría estar involucrado en este mecanismo. Además, experimentos de inactivación del pulvinar dorsal (PulM) provocan una sintomatología de negligencia en el hemisferio contralateral a la inactivación, con una elevada disminución de las sacadas. Esto nos indica que el pulvinar dorsal está ejerciendo un papel crucial en la realización de los movimientos sacádicos (Wilke et al. 2010).

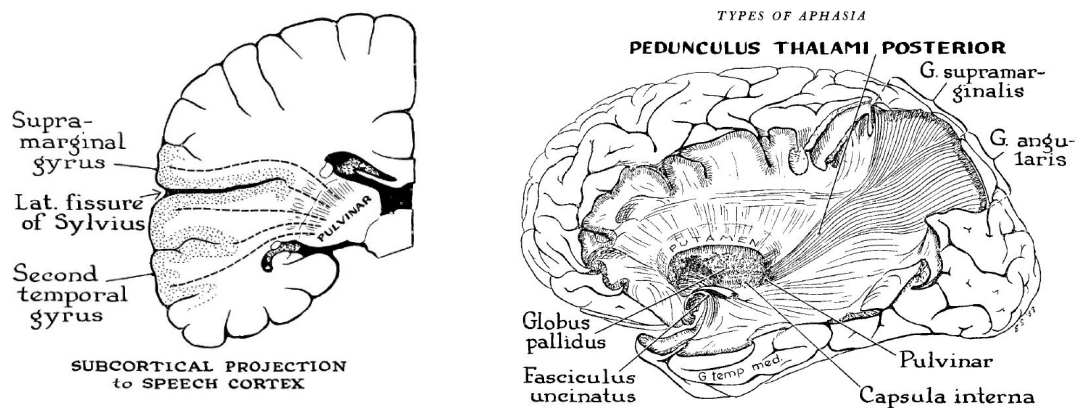
En un trabajo reciente del mismo grupo (Dominguez-Vargas et al. 2017), también se describe que la microestimulación eléctrica del pulvinar dorsal, sesga la dirección hacia la que se realiza la sacada de una forma dependiente del tiempo en el que se produzca. Cuando se presentaban estímulos unilaterales, la microestimulación del PulM antes del inicio del estímulo, disminuía el tiempo de reacción de las sacadas hacia las dianas localizadas en el hemisferio en el que realizaba la estimulación. Sin embargo, si la microestimulación se producía durante y después del inicio del estímulo, se producía demora sistemática del tiempo de reacción de las sacadas para estímulos localizados tanto ipsi como contralaterales. En el caso de dianas

bilaterales, la microestimulación antes del inicio del estímulo, incrementaba la elección de sacadas ipsilaterales. Por el contrario, la estimulación después del inicio del estímulo, incrementaba la elección de sacadas contralaterales. Estos cambios en el comportamiento sacádico indica que el PulM juega un papel primordial en la planificación motora mas que en el mero procesamiento visual, y que este efecto ejerce su mayor influencia en elecciones espaciales cuando la decisión y la acción están temporalmente cerca.

#### 1.4.6. Implicación del complejo pulvinar en la producción de lenguaje

La implicación del tálamo en la producción del lenguaje ha sido deducida, en gran parte, por los síntomas de afasia subcortical provocada por lesiones en el núcleo ventral anterior o en la región posterior del tálamo dominante (generalmente el izquierdo) (Crosson 2013).

En su completa monografía “Speech and Brain Mechanisms”, Penfield y Roberts 1959, aunaron indicios obtenidos de casos de lesiones talámicas en humanos con la disección de tractos de encéfalos fijados. Observaron que el área del habla posterior, compuesta por una amplia área en las regiones temporal posterior y parietal posterior inferior (giro supramarginal y angular), presentaba una importante conectividad con el complejo pulvinar y el núcleo LP **Figura 20**. Además, observaron el caso de un paciente con una lesión hemorrágica en el pulvinar, que presentaba afasia que se mantuvo como afasia nominal posteriormente.



**Figura 20. Tractos implicados en el papel del complejo pulvinar en el lenguaje.**  
Tomado de Penfield y Roberts 1959



Posteriormente, Ojemann et al. 1968, realizaron en pacientes estimulaciones talámicas que involucraban parte del PulM<sup>1</sup> a la vez que realizaban una prueba de nominación de objetos. Observaron que la estimulación del PulM provocaba un defecto de anomia en el habla. Además, la latencia y el tiempo de espera hasta encontrar la palabra correcta se incrementaba significativamente con la estimulación. De esta forma, los autores hipotetizaron que el PulM podría estar sincronizando distintas áreas corticales que representan distintos aspectos semánticos del objeto a ser nombrado. La interrupción de esta sincronización llevaría, por tanto, al error de nominación del objeto en cuestión. Otros estudios, también han confirmado el papel del PulM en el lenguaje; se ha descrito, por ejemplo, la activación del PulM por medio de RMf en el caso de una tarea de recuerdo de nombres (Assaf et al. 2006).

En un modelo heurístico reciente propuesto por Crosson 2013, se sintetiza el posible papel del PulM en el lenguaje, que podría el reclutamiento selectivo de áreas relacionadas semánticamente por medio de la sincronización y en la posible facilitación de la transferencia de la información por medio de las rutas transtalámicas.

#### *1.4.7. Papel del complejo pulvinar en el reconocimiento de caras*

En sociedades jerárquicas avanzadas, como las que encontramos en primates, el reconocimiento de las caras, tanto de su identidad como de su componente emocional juega un papel crucial en la capacidad del individuo para adaptarse a su entorno y en su supervivencia (Parr 2011). Ante la presentación de la imagen de una cara en el campo visual, se activan selectivamente regiones o parches discretos de poblaciones neuronales localizadas en el giro fusiforme, la corteza occipital lateral, surco temporal superior y giro temporal inferior (Rosenfeld y Van Hoesen 1979; Kanwisher et al. 1997; Haxby et al. 2000). Las regiones implicadas en el reconocimiento de caras, están altamente interconecadas con los componentes del complejo pulvinar; PulM, PulL y Pull (Grimaldi et al. 2016). Además, también se ha observado gran activación de otras estructuras subcorticales como el colículo superior y el complejo amigdalino (Revisado extensamente en Todorov 2012). El papel del PulM en el reconocimiento de caras se sugiere en la gran expansión que ha tenido este núcleo (Stepniewska 2003), que podría estar correlacionado con el aumento de la complejidad social en primates.

El procesamiento de la información de los estímulos de caras ha sido dividido en dos etapas: una etapa rápida subcortical, con latencias en pulvinar menores de 60ms; y una etapa tardía del

---

<sup>1</sup> Aunque Ojemann et al. 1968 localizaba los electrodos en la región superior del PulA, un trabajo moderno de revisión del mismo grupo (Hebb y Ojemann 2013) localiza las trayectorias de los electrodos en PulM, CL y VPL.

procesamiento consciente cortical, con latencias en pulvinar mayores de 60ms, que ya implicarían el procesamiento cortical, ya que la latencia media que se observa en V1 es 66ms (Schmolesky et al. 1998).

La vía subcortical implica la ruta directa de la información visual a la amígdala: en una progresión anatómica directa de la retina, al colículo superior, complejo pulvinar y finalmente, el núcleo lateral de la amígdala. Esta ruta presenta tiempos de latencias cortos en pulvinar y amígdala), y esta encargada del procesamiento rápido e inconsciente de estímulos relevantes para el individuo, generalmente de estímulos visuales, con poca resolución pero que presentan la información global del objeto, denominados de baja frecuencia espacial (Pessoa 2005; Pessoa y Adolphs 2010; Tamietto y de Gelder 2010; Meaux y Vuilleumier 2016). En un trabajo reciente, los autores mantienen que esta vía subcortical no es selectiva en términos de la frecuencia espacial (información global vs información de detalles y fina) o del contenido emocional de las caras, de modo que, transmite rápidamente de forma general información visual no filtrada a la amígdala (McFadyen et al. 2017). La contribución del complejo pulvinar en la vía subcortical ha sido estudiada funcionalmente en el ámbito de la visión ciega con contenido afectivo o emocional (de Gelder et al. 1999; de Gelder et al. 2000; Morris et al. 2001) y en representaciones enmascaradas de expresiones faciales, cuando se enmascara el estímulo entre otros distractores, (Morris et al. 1999; Pasley et al. 2004; Williams et al. 2004). En ambas situaciones, se observa en amígdala una respuesta temprana a pesar de la ausencia o inactividad de la corteza visual estriada; posiblemente gracias a las conexiones desde el complejo pulvinar.

A pesar de que la existencia de esta ruta de procesamiento subcortical está ampliamente aceptada, algunos estudios rebaten esta visión y mantienen que la etapa temprana para reconocer caras atemorizantes depende de las altas frecuencias espaciales, que necesitan de la activación de corteza (Adolphs et al. 2005; Stein et al. 2014). Además, la base anatómica propuesta de la vía subcortical no estaría del todo clara. Ya que, la conectividad entre el complejo pulvinar y el amigdalino requiere verificación (cf conectividad subcortical PulM). Así mismo, no hay un acoplamiento entre las regiones del complejo pulvinar que reciben información visuotópica del CS, localizadas en PulI (Benevento y Rezak 1976b; Harting et al. 1980; Benevento y Standage 1983), y las que presumiblemente proyectan al complejo amigdalino, localizadas en PulM (Jones y Burton 1976a; Aggleton et al. 1980; Romanski et al. 1997). En la tupaya sí se ha establecido esta ruta a través del pulvinar dorsal, ya que en esta especie esta región sí recibe aferencias visuotópicas del CS (Day-Brown et al. 2010) y a su vez, proyecta a la amígdala lateral. Los estudios realizados en humanos con tractografía (DTI) sugieren la existencia de la ruta directa del CS-pulvinar-amígdala (Tamietto et al. 2012; Abivardi y Bach 2017). No obstante, no queda

claro si este tracto solapa en la misma zona del pulvinar ya que según los datos previos anatómicos esto no sucede, por ello la existencia de esta ruta requieren validación con experimentos de trazado neuronal en primate.

La vía consciente cortical, se infiere en los datos electrofisiológicos del complejo pulvinar como la respuesta tardía que precede a la temprana explicada anteriormente (a partir de 60ms) y se debe a las aferencias desde cortezas asociativas, temporales y prefrontales (Nguyen et al. 2013). Los experimentos electrofisiológicos en pulvinar medial y lateral realizados en primates no humanos (macacos), han demostrado la existencia de neuronas que responden selectivamente a caras y al componente emocional asociado a las expresiones faciales (Maior et al. 2010). El análisis poblacional de las neuronas que se activan selectivamente con las caras muestran que se pueden extraer características selectivas más complejas (de género e identidad) que las que se aprecian en neuronas únicas (Nguyen et al. 2013). Sin embargo, estas respuestas sólo fueron significativas para caras observadas de frente y no presentaron ninguna significación para la orientación de la mirada. Esto se debe probablemente, a que esta información requiere de un mayor procesamiento cortical (Nguyen et al. 2016). En humanos, se ha observado con RMf la activación del complejo pulvinar ante la presentación de caras con información emocional (felicidad o ira); en estos experimentos el pulvinar muestra una fuerte activación selectiva a información emocional tanto de caras completas como parciales (Meaux y Vuilleumier 2016). Finalmente, en humanos se ha descrito que la lesión unilateral del pulvinar viene aparejado con un déficit para el reconocimiento del contenido emocional de las caras localizadas en el campo contralateral a la lesión (Ward y Arend 2007). En el estudio de Ward y Arend (2007) es interesante la adscripción unívoca del PulM en el déficit señalado, para ello realizaron pruebas en otros dos pacientes que presentaban lesiones en PulL y en PulA, y observaron que en estos sujetos la capacidad de reconocimiento emocional se mantenía intacta.

## **II. OBJETIVOS**

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de conocer los circuitos que a través del tálamo pueden comunicar unas áreas corticales con otras. Los núcleos talámicos asociativos o de alto orden que son los más desarrollados en el tálamo de primates parecen ocupar un puesto central en dichas vías transtalámicas (Sherman y Guillery 2011). El más extenso de los núcleos asociativos del tálamo de primate es el complejo pulvinar. De este complejo son mejor conocidos los núcleos lateral e inferior donde se obtienen respuestas a la estimulación retiniana y que se encuentran conectados con áreas visuales estriada y extraestriadas. Por el contrario, apenas se ha estudiado la división medial de este complejo que no responde directamente a estimulación retiniana y esta conectada con áreas corticales asociativas parietales, frontales y temporales.

Así, el objetivo principal de este trabajo es realizar el análisis de la conectividad del núcleo pulvinar medial (PulM) con técnicas de trazado axonal de alta resolución en el primate neocortical *Callithrix jacchus*.

Por una parte, buscamos determinar la distribución a las distintas áreas corticales de los axones talamocorticales procedentes de pequeñas regiones identificadas dentro del PulM. Además, queremos aclarar la posible existencia de axones divergentes innervando simultáneamente regiones corticales distantes. Por último, queremos investigar la posibilidad de que dentro del PulM delineado citoarquitectónicamente existan regiones hodológicamente diferenciadas. Pretendemos, además, aportar información en una especie de primate que en la última década se ha convertido en un modelo central en la investigación neurobiológica y de la que apenas existen datos al respecto.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, nos planteamos

1. Mapear la distribución tangencial de los axones tálamo-corticales (TC) del núcleo pulvinar medial a distintas áreas del hemisferio cerebral.
2. Identificar posibles compartimentos hodológica de posibles compartimentos o regiones dentro del pulvinar medial
3. Analizar la posible existencia de diferencias distribución laminar y tamaño de las varicosidades terminales de los axones TC del núcleo pulvinar medial en distintas áreas corticales.
4. Determinar la posible existencia de proyecciones axonales bifurcadas hacia distintas áreas corticales.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. ANIMALES

Los datos analizados en esta tesis han sido obtenidos de un total de 17 titís comunes adultos (*Callithrix jacchus*), con edades comprendidas entre los 16 meses a 4 años y de ambos sexos (11 machos y 6 hembras). Las cirugías para realizar los depósitos de trazadores, perfusión y extracción del cerebro fueron realizadas en Brasil por los doctores Francisco Clascá y Pablo Rubio en el marco de un proyecto de colaboración entre la universidad Autónoma de Madrid (UAM) y la universidad federal del Rio Grande do Norte (UFRN, Natal Brasil). Dos animales (casos 26 y 27) fueron obtenidos de un estudio piloto realizado en la Universidad Federal de Rio de Janeiro (UFRN). Los procedimientos experimentales contaron con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y se realizaron de acuerdo con las directrices europeas (Directiva 2010/63/UE) y españolas, estas últimas refundidas y actualizadas en el R.D. 53/2013, del 1 de febrero, para el uso de animales en investigación. Además, cada procedimiento tuvo que ser aprobado previamente por el comité ético del centro de Bio-ciencias de la UFRN y el centro de ciencias de la salud de la UFRJ (CEUA 029/2016). La histología, examen microscópico y el análisis de los datos fueron realizados por la doctoranda en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la UAM.

## 1 PROTOCOLOS GENERALES DE ANESTESIA, CIRUGÍA Y PERFUSIÓN

Se realizó un protocolo de pre-anestesia, para facilitar la manipulación de los animales y su colocación en el aparato estereotáxico, con una mezcla de Ketamina (66mg/kg, Imalgene 500®, laboratorios Merial, Barcelona, España) y xilacina (8mg/kg, Rompur®, Bayer, Barcelona, España) inyectada intramuscularmente. Posteriormente, los animales fueron emplazados sobre una manta térmica de circulación de agua caliente que mantenía al animal a una temperatura constante de 37 °C (T/Pump, Gaymar Industries, Orchard Park, Nueva Jersey, EE. UU.), se les rasuró la cabeza que fue posicionada en el aparato estereotáxico (Narishige, Tokio, Japón en la UFRN, o Kopf, Tujunga, CA, EE. UU. en la UFRJ). Una máscara de látex, posicionada en el hocico del animal, proveyó de un flujo constante de isoflurano (AbbviSpain®, Madrid, España) durante el procedimiento quirúrgico con una concentración de inducción del 3-4% y de mantenimiento del 1-2% en oxígeno puro usando un sistema de administración inhalatorio (Fluovac system®, Harvard Apparatus, Massachusetts, EE. UU.). Para proteger las córneas de la desecación, los ojos

fueron cubiertos con vaselina líquida. Se realizó la monitorización de las constantes vitales por medio del electrocardiograma (ECG TEB, Tecnología Electrónica Brasileira, Brasil) y la medición de la frecuencia respiratoria a lo largo de la cirugía. Se ajustó el nivel del isoflurano para mantener al animal arrefléxico, hemodinámicamente estable (190-240 latidos por minuto) y respirando espontáneamente. A lo largo del procedimiento, se administraron pequeñas cantidades de suero fisiológico subcutáneamente (1,5cc/hora) para prevenir la deshidratación. Terminada la cirugía, se procedió a aplicar analgesia postoperatoria con un derivado opioide sistémico (Bupremorfina, 0.01 mg/kg/12hrs, i.m., Buprenex®, Reckitt Benckiser Healthcare, RU). Además, para evitar infecciones se aplicó una dosis única del antibiótico de larga duración sodio-Cefovecina (8mg/kg Convenia®, Zoetis, Bélgica).

Todos los instrumentos quirúrgicos y material fueron autoclavados. Se aplicó una solución antiséptica de povidona yodada (Betadine®, Viatris, Burdeos, Francia) en el cuero cabelludo y a continuación, se realizó una incisión a lo largo de la línea media en sentido de rostral a caudal. Se retrajo la piel a ambos lados y en el caso de los depósitos más laterales en corteza temporal inferior, se dejó libre una zona requerida de hueso retrayendo la cantidad necesaria de la inserción del músculo temporal usando un periostotomo romo para evitar un sangrado excesivo.

Las coordenadas en las que se debía realizar los depósitos de los trazadores fueron decididas a priori usando como guía los valores recogidos en el atlas de tití común de Paxinos et al. 2012. Primero se localizó la punta de la pipeta, cargada con el trazador, en la intersección del cero interaural y mediolateral, y a continuación, a partir de este punto se desplazó la pipeta mediolateral y anteroposteriormente hacia las coordenadas dónde se encontraban nuestras regiones de interés. Con un rotulador indeleble se dejaron marcas en el cráneo sobre las localizaciones diana y se realizaron craniectomías con una broca de dentista (Dremel® modelo 255, Dremel Europa) hasta dejar una fina capa de hueso. Para evitar el excesivo calentamiento del cráneo por la fricción de la broca se añadió una solución constante de suero salino frío. La fina capa de hueso fue cortada delicadamente con un bisturí y levantada cuidadosamente con unas pinzas de punta fina. En caso de que fuera necesario se ensanchó el trépano con la ayuda de una pinza gubia. Este procedimiento fue repetido en todas las localizaciones que requirieran trépano dejando la duramadre intacta en cada uno para evitar que se secase la superficie cortical. Mientras se realizaban los procedimientos indicados anteriormente, se fueron cargando los trazadores en la pipeta o microjeringa, para el caso de los experimentos de trazado anterógrado o de los experimentos de marcaje retrógrado respectivamente. Una vez estuvieran cargados y todas las osteotomías realizadas, se procedió a romper la duramadre y dejar al descubierto la superficie cortical y se realizó la inyección de los trazadores. Los parámetros de cada inyección



de trazador, anterógrado o retrógrado, serán explicados en sus apartados correspondientes. En todo el proceso se mantuvo húmeda la región expuesta de la corteza añadiendo suero salino estéril. Los casos con depósitos que produjeron resultados válidos están numerados en la **Tabla 7**.

Terminada la inyección del trazador, las osteotomías fueron ocluidas con una lámina de espuma de Gel hemostático (Espongostan film®, Ferrosan, Soeborg, Dinamarca), y el trépano fue ocluido con cemento dental acrílico (Duralay, Reliance Dental Mfg. Co. Chicago, IL, EE. UU.). Finalmente, se suturó en planos el músculo temporal, la fascia y la piel con hilo de seda trenzada estéril 2/0 (Lorca-Martín, Murcia, España).

Entre 15 y 21 días después de la cirugía de administración de trazadores, los animales fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico (1mmg/kg i.p.). Inmediatamente después que el animal alcanzara un estado arrefléxico (reflejos nociceptivos flexor y corneal) profundo se procedió rápidamente a realizar una toracotomía y se incidió en el saco pericárdico para dejar expuesto el corazón con sus cámaras. A continuación, se canuló la aorta ascendente a través del ventrículo izquierdo desde su ápex hasta observar que la punta de la cánula aparecía por la aorta. Por medio de una pinza hemostática se mantuvo la cánula en el lugar. Durante los pasos anteriores, de la cánula salía suero salino a baja velocidad, en el momento que la cánula se encontraba en la aorta, se procedió a incidir en la aurícula derecha y se aumentó la velocidad de salida del suero salino para conseguir un lavado rápido de la sangre de la circulación sistémica. Cuando se observó que el líquido que salía por la aurícula derecha era transparente, que solía producirse para un volumen de 500ml de suero salino, se procedió a cambiar el líquido de lavado por el líquido de perfusión. Los líquidos de perfusión fueron los siguientes; 2 litros de paraformaldehído al 4% en PB 0,1M pH 7,4, suministrado durante un tiempo aproximado de una hora, y 1 litro de paraformaldehído al 4% en PB 0.1M pH7,4 con 15% de sacarosa durante otros 15 minutos.

Pasado el tiempo reseñado anteriormente, el animal fue decapitado y la bóveda craneal y la duramadre fueron retiradas. La cabeza fue posicionada de nuevo en el aparato estereotáxico y se tomaron las medidas anteroposteriores 0.0mm y +10mm, que se corresponden a la altura del final del hipocampo y de la comisura blanca anterior, respectivamente. En estos puntos, se llevó a cabo el bloqueo del cerebro en el plano coronal, realizando incisiones continuas con una hoja de bisturí orientada perfectamente en el plano coronal que estaba acoplada a un adaptador de la torre estereotáxica. Los tres bloques obtenidos se retiraron suavemente de la base del cráneo, cortando cuando fuera necesario las ramas de los nervios de los pares craneales, y se

postfijaron en la última solución de perfusión durante 24 horas. El primer bloque contenía gran parte del lóbulo frontal y el extremo más polar del lóbulo temporal, el segundo contenía gran parte de la amígdala y la totalidad del tálamo, y el tercero contenía el lóbulo occipital y parte caudal de los lóbulos temporal y parietal. Finalmente, para crio-proteger el tejido se dejaron los bloques en una solución de sacarosa al 30% en PB 0.1M a 4 °C hasta que hundieron.

## **2 EXPERIMENTOS DE INYECCIONES DE TRAZADO ANTERÓGRADO CON DEXTRANO BIOTINILADO**

Las proyecciones desde el núcleo pulvinar medial (PulM) a la corteza cerebral fueron analizadas realizando depósitos por iontoforesis de dextrano biotinilado (BDA) de 10KDa (Molecular Probes, Eugene OR, EE. UU.) diluido al 10% en tampón fosfato 0,01M a pH 7,4 en cada hemisferio. El BDA inyectado por iontoforesis produce el marcado anterógrado de axones con gran resolución morfológica, además esta técnica tiene capacidad para realizar inyecciones pequeñas confinadas a una porción del núcleo de interés (Reiner et al. 2000). El trazador fue inyectado por medio de micropipetas de borosilicato con capilar interno que fueron rellenadas por el trazador gracias a la capilaridad (FHC, Bowdoin, ME EE. UU.). Los tubos con capilares fueron estirados previamente usando un estirador vertical (Modelo 700c, David Kopf instruments, Tujunga, California), estas puntas fueron cortadas bajo la lupa usando un bisturí. Posteriormente medimos las puntas obtenidas con un objetivo de 40X utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 que tenía acoplada una cámara digital (Nikon DMX1200) y utilizando la herramienta de medida del software NIS (cf. Análisis del material). Con este método se obtuvieron pipetas con un diámetro interno de 10-20  $\mu\text{m}$ . Usando un micro-manipulador, las pipetas fueron localizadas en las coordenadas anteroposteriores y mediolaterales elegidas. Tras retirar la duramadre, se descendió la pipeta hasta que llegaba a tocar la superficie cortical, y a partir de allí se prosiguió de forma lenta y constante hasta llegar a la distancia de profundidad indicada en el atlas. Los parámetros de las inyecciones fueron: intensidad de corriente de 0,4 a 4  $\mu\text{A}$ , pulsos de corriente positivos con ciclos de 7 segundos on/off y una duración aproximada de 20 minutos. Los pulsos de corriente fueron transmitidos al líquido en el interior de la pipeta que contenía el trazador por medio de un electrodo conectado a un generador de corriente continua (Midgard, Stoelting Co., Wood Dale, IL EE. UU.). Terminado el tiempo de paso de corriente, la pipeta se dejó en reposo en el sitio durante 10 minutos para evitar el reflujo del trazador.

### 3 EXPERIMENTOS DE DEPÓSITOS DE TRAZADORES RETRÓGRADOS

Para analizar la existencia de colaterales además de analizar parte de la topografía dentro del núcleo se realizaron inyecciones de trazadores neuronales retrógrados en distintas combinaciones (cf. **Tabla 7**) con jeringas de 10 $\mu$ l (Nanofil, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE. UU.) cuyo extremo distal tenía un calibre del 36 (110  $\mu$ m de diámetro externo). La ventaja de usar jeringas con punta tan fina es que se evita producir una lesión grande en el tejido cortical. Los trazadores aplicados fueron Fast Blue (FB, Polysciences, Inc, Warrington, EE. UU.) al 1% en tampón cacodilato 0,1M, subunidad B de la toxina colérica libre (CTB, Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.) al 2% en tampón Tris 0,05M, CTB conjugada con Alexa fluorescente 594 o Alexa fluorescente 488 (CTB-Rojo o CTB-verde, Life technologies, ThermoFisher, Eugene, EE. UU.) en una concentración del 1,5% en tampón PBS 0,1M.

La jeringa cargada con el trazador fue acoplada a una torre estereotáxica y posicionada en las coordenadas AP y ML de interés. En la punta de la microjeringa, se habían realizado previamente dos marcas con tinta indeleble que indicaban la distancia desde el extremo a 500  $\mu$ m y 1000  $\mu$ m respectivamente. Gracias a estas marcas con control visual se podía controlar la profundidad a la que se estaba inyectando el trazador. Este procedimiento se realizó con ayuda de un microscopio quirúrgico tipo II Zeiss-Jena, el trazador fue inyectado en ambas profundidades liberando en cada una un volumen de 100nl. Tras la realización del depósito la jeringa se dejó en el sitio por un tiempo de 5 minutos para reducir el reflujo del trazador. En todas las localizaciones corticales se realizaron de 3 a 7 inyecciones adyacentes para impregnar gran extensión de la corteza. Debido a que uno de nuestros objetivos era comprobar la existencia de neuronas que inervaban simultáneamente dos áreas corticales se utilizaron trazadores fluorescentes que no tuvieran solapamiento en sus espectros de emisión y en los que los somas marcados retrógradamente pudieran ser distinguidos sin ambigüedades. Aunque FB y CTB-verde presentan un pequeño solapamiento en las colas de sus espectros de forma que el CTB-verde puede entrar parcialmente en el filtro ultravioleta (UV) el aspecto cromático de ambos es completamente discernible.

Los depósitos de trazadores retrógrados se realizaron en regiones corticales con proyecciones axónicas marcadas anterógradamente de forma consistente tras realizar depósitos de BDA en una zona del PulM rostral. Estas regiones se localizaban en las cortezas prefrontal ventral, temporal inferior y parietal inferior. El acceso para realizar la osteotomía en cada una de estas se realizó de forma diferente. Los depósitos en las cortezas parietal y temporal fueron

realizados posicionando la jeringa perpendicularmente respecto a la superficie pial, y posteriormente se realizaron tres depósitos de 100nl en cada profundidad. Como se querían realizar depósitos grandes el proceso se repitió de 3 a 7 veces en las zonas corticales adyacentes. En el caso de la corteza prefrontal ventrolateral, el abordaje tuvo que realizarse de forma diferente. Debido a la convexidad de la corteza, la jeringa fue colocada verticalmente respecto al opérculo frontal y se realizaron dos inyecciones, la primera más distal y la segunda en una posición un poco más medial, siempre dejando distancia de seguridad respecto a la sustancia blanca. Ambos depósitos atravesaron en sentido dorso-ventral las cortezas de la región ventrolateral.

## **4 CORTE Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DEL TEJIDO**

### **4.1. Corte seriado**

Tras la crioprotección los bloques fueron cortados en el plano coronal usando un microtomo de deslizamiento acoplado a una unidad de frío (Leica) en secciones de 40µm de grosor. Las secciones fueron recogidas de forma ordenada en placas multipocillo con PB 0,1M siguiendo un esquema seriado, de forma que se obtuvieron 6 series sucesivas en las que cada serie contaba con cortes equidistantes de todo el bloque; de esta forma la distancia entre cortes dentro de la misma serie siempre fue de 240µm. Las tres primeras series fueron destinadas en todos los animales para las mismas técnicas; la serie primera se utilizó para visualizar la fluorescencia, la serie segunda para el revelado del BDA y la tercera para realizar la histoquímica para la actividad de la enzima acetil colinesterasa junto con la tinción de Nissl (Nissl/AchE). El resto de series fueron utilizadas en algunos animales para realizar técnicas complementarias; inmunohistoquímica para el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2), histoquímica para la enzima citocromo oxidasa (CyO) y como reserva para otros proyectos que se están llevando a cabo en el laboratorio. Dado que estamos trabajando con tejido de primates fuimos muy cuidadosos en la forma de etiquetar las placas multipocillo, y en procesar el material rápidamente tras ser cortado. Si algunas series no iban a ser procesadas en la semana posterior al corte, fueron recolocadas en placas multipocillo con solución anticongelante (compuesta por glicerol, etilenglicol y PB 0,1M a partes iguales) y se conservaron a -20 °C.

Finalizada cada técnica histológica se procedió a montar cuidadosamente con un pincel las secciones sobre portaobjetos gelatinizados (Menzel-Glaser®, Menzel GmbH y Co KG) rotulados con un lápiz de diamante. Durante el proceso de montaje tuvimos gran cuidado de estirar las

arrugas que se producían en el tejido mientras se secaba y de retirar los extremos sueltos de la fimbria del tálamo. A continuación, las portas se dejaron secar a temperatura ambiente (cubiertos con film o papel de aluminio en el caso de la fluorescencia para evitar la entrada de polvo) durante la noche. Posteriormente, se deshidrataron los cortes en alcoholes ascendentes (70º, 90º y 100º) y se desengrasaron en xilol. Finalmente, los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos de cristal utilizando DePeX (Serva, Heidelberg, Alemania) como adhesivo.

## 4.2. Experimentos de trazado anterógrado

Para constatar si la inyección de BDA había sido un éxito siempre revelábamos primero el bloque central que contenía tálamo, de esta forma si no había salido la inyección estábamos a tiempo de ahorrar material de revelado y series que podían ser aprovechadas en otras técnicas. Todo el proceso se realizó en flotación y agitación.

Para visualizar el BDA primero realizamos el bloqueo de la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 2% en PB 0,1M durante 20 minutos. Seguidamente tras realizar lavados intensos de PB 0,1M procedíamos a incubar a 4 °C durante 12 horas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vectastain Elite®, Laboratorios Vector, Burlingame, CA) en PB 0,1M con tritón al 1% (TX-100). Seguidamente, se realizaron varios lavados de PB 0,1M que se cambiaron posteriormente a lavados con el tampón acetato sódico (TAS) 0,1M y a continuación, se reveló la actividad peroxidasa en TAS 0,1M con DAB (3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico, Sigma, San Luis, MO; 0.02%) intensificando la reacción con el método de Shu et al. (1988) que añadía a la solución de revelado sulfato amónico de níquel (1,2% níquel sulfato, 0,02% sulfato amónico). La enzima de la reacción fue glucosa oxidasa al 0,003% que usaba como sustrato D-glucosa al 0,2%. Este abordaje tiene la ventaja, respecto al revelado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de permitir un revelado muy controlado sin que se produzcan depósitos inespecíficos de DAB en el tejido. El proceso de revelado se controló con inspección visual hasta que se apreciaban los plexos de marcado en corteza. El tiempo de revelado en los distintos casos se encontró en un rango comprendido entre 50 minutos y dos horas. Tras el revelado se procedió a lavar intensamente, primero con TAS 0,1M y a continuación con PB 0,1M.

Tras esto se procedió a realizar el montaje descrito en la parte general de procesamiento histológico. Después de dejar secar los cortes toda la noche, se procedió a contrateñir las secciones con tiónina diluida (1:10). Gracias a la contratinción de tiónina se puede realizar parte de la delimitación histológica en tálamo, además de facilitar el proceso de reconstrucción tangencial ya que permite distinguir algunas estructuras anatómicas en la serie que tiene los elementos a

reconstruir (axones marcados con BDA). Finalmente se procedió a deshidratar, desengrasar y cubrir los portaobjetos como se indicó anteriormente.

### 4.3. Histoquímica para detectar la enzima acetil colinesterasa (AChE)

Se siguió un protocolo desarrollado por Geneser-Jensen y Blackstad (1971) y modificado para primates (macaco) por Cavada et al. 1995. El medio de incubación contenía una sal de yoduro de acetiltiocolina al 0,1%, que funcionaba como un sustrato sintético de la enzima AChE presente en el tejido, junto con sulfato de cobre al 0,05% y glicina en TAS al 0,41% pH 5. Al medio de incubación, se añadió etopropazina al 0,023% para inhibir la actividad de las colinesterasas inespecíficas. El tejido se mantuvo en el líquido de incubación hasta que se apreciaron cambios en el aspecto del tejido, de forma que las zonas más ricas en AChE cambiaban a un blanco opaco. Este tiempo varió entre 4 a 5 horas y media. Tras este periodo de incubación, se realizaron varios lavados en TAS 50mM pH 5. Posteriormente, las secciones fueron transferidas a la solución de revelado y de intensificado que contenían una solución de nitrato de plata al 0,5% y una solución al 5% de tiosulfato de sodio.

### 4.4. Tinción de Nissl

La tinción de Nissl, o de violeta de cresilo, está basada en la afinidad de los colorantes básicos por sustancias ácidas como son el ADN y ARN de los somas neuronales. De forma que, esta tinción es útil para delimitar núcleos en función del tamaño global y disposición de las neuronas que lo conforman.

Para realizar esta tinción, primero montamos los cortes en portas gelatinizados y los dejamos secar un día. A continuación, introducimos los portaobjetos en etanol al 100% y cloroformo (1:1) durante 12 horas. Al día siguiente se realizaron lavados rápidos en agua destilada y se tiñeron dentro de un baño maría a 30 °C con violeta de cresilo durante 20 minutos; tras lo cual se volvieron a aclarar rápidamente con agua destilada. Seguidamente, los portaobjetos se pasaron por alcoholes de 70% y 95% y posteriormente en cloroformo al 100% en agitación. Los cortes se diferenciaron con una solución de alcohol acético controlando la cantidad de diferenciación de forma visual. Posteriormente se realizaron varios lavados con alcohol al 100% y por último se procedió a cubrir las secciones como mencionábamos antes.

#### 4.5. Histoquímica para detectar la enzima citocromo oxidasa

Utilizamos el protocolo descrito por Wong-Riley 1979, para realizar la detección de la actividad de la enzima citocromo oxidasa. Esta enzima es importante para el metabolismo celular encontrándose en la membrana interna de las mitocondrias. Se ha observado, que las neuronas que presentan mayor actividad al requerir mayor energía presentan este sistema más desarrollado, lo que implica mayor reactividad de la enzima. De esta forma podemos apreciar mayor actividad CyO en áreas corticales sensoriales primarias y en núcleos talámicos de relevo (Wong-Riley y Norton 1988).

Para revelar la actividad diferencial de esta enzima, inducimos su activación enzimática aportando sus sustratos naturales que son citocromo C al 0,04%, y sacarosa al 4% en una solución de PB 0,1M, junto con DAB al 0,05% que al oxidarse polimeriza formando un precipitado marrón. La incubación se realizó en una estufa a 37 °C, en oscuridad, y fue controlada visualmente cada 45 minutos hasta que se diferenciaron las zonas con mayor reactividad en el tejido. Posteriormente se realizaron varios lavados con PB 0,1M frío para detener la reacción enzimática. Tras esto, se realizó el montaje y demás pasos hasta obtener los portaobjetos listos para su visualización.

#### 4.6. Inmunohistoquímica para el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2)

Como hemos visto en introducción (cf. Apartado de subdivisiones), numerosos investigadores han intentado solucionar el problema de la ambigüedad en la delimitación del complejo pulvinar con el uso de diversas técnicas histológicas, entre ellas Nissl, AcE, CB y PV. Sin embargo, la combinación de estas tinciones no logra despejar del todo las dudas acerca de la delimitación del PulM, cuyos límites varían enormemente en los distintos estudios existentes, siendo la opción más aceptada actualmente la que mantiene que el PulM es la parte del complejo pulvinar que no presenta una reacción intensa para ninguna tinción de forma global<sup>2</sup>.

En el trabajo de Balaram et al. 2013 se describió por primera vez la expresión del transportador vesicular de glutamato tipo 1 (VGluT1) y tipo 2 (VGluT2) en la vía visual de macaco, estos autores destacaron que VGluT2 tenía una distribución diferencial en el complejo pulvinar.

---

<sup>2</sup> En los experimentos de Cavada et al. 1995 en macacos se puede observar una zona central dentro de PulM que presenta mayor actividad AchE y que podría suponer un correlato histoquímico de una región del PulM que inerva selectivamente la corteza prefrontal. Pese a este hecho interesante nuestras tinciones de AchE no mostraron una tinción más intensa en dicha zona, lo que nos podría hablar de una diferencia entre primates del viejo y nuevo mundo.

Sin embargo, en dicho trabajo solo se muestra un nivel coronal que no nos permite apreciar como varía el patrón a lo largo del complejo pulvinar. En otro estudio (Rovo et al. 2012), se puede observar a grandes rasgos, como varía la expresión de VGlut2 a lo largo de todo el tálamo de macaco. No hemos encontrado ningún estudio con inmunohistoquímica frente a VGlut2 realizado en primates del nuevo mundo; debido a ello, nos pareció interesante realizar esta tinción como complemento en la delimitación de las subdivisiones del núcleo pulvinar que reciben aferencias subcorticales.

La técnica inmunohistoquímica para detectar la distribución de VGlut2 en las secciones de tejido se realizó de forma indirecta; con una cadena de dos anticuerpos. El primero (anticuerpo primario, Ac 1) estaba dirigido contra una determinada secuencia de aminoácidos de la proteína a detectar y el segundo (anticuerpo secundario, Ac 2), estaba biotinilado y se unía al Ac 1 por varios epítomos de su fracción constante. Al estar biotinilado el Ac 2, se pudo visualizar la localización de los anticuerpos por medio del complejo enzimático avidina-biotina-peroxidasa (ABC). De esta forma la detección del anticuerpo presente en el tejido se amplificó en dos pasos, primero al Ac 1 se unieron en gran número los Ac 2 y segundo, las biotinas del complejo pueden unirse hasta a cuatro avidinas diferentes (Bratthauer 2010) lo que produce una gran amplificación.

Los cortes se mantuvieron en flotación en placas multipocillos y en agitación constante hasta el momento del montaje. El protocolo utilizado fue el siguiente; se procedió a inactivar la actividad peroxidasa inespecífica con una disolución de  $H_2O_2$  al 2% en PB 0,1M durante 20 minutos. Posteriormente se realizó la preabsorción de uniones inespecíficas del Ac 2, incubando el tejido durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución de PB al 0,1M que contenía suero del animal del que fue obtenido el Ac 2; en este caso fue realizado en cabra por lo que preincubamos en una solución que contenía suero de cabra al 5%. Además, esta solución contenía Tx-100 al 2%, suero de caballo al 5% y albúmina de suero bovino (BSA) al 1%; esta solución se utilizó también para los anticuerpos.

Tras esta preabsorción realizamos la incubación del Ac 1 policlonal contra VGlut2 obtenido en conejillo de indias a una concentración 1:2000 (Millipore Bioscience Research Reagents, cat. No. AB2251) durante 12 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación del AC 1, las secciones se lavaron en agitación numerosas veces en PB 0,1M y posteriormente, se realizó la incubación en el Ac 2 policlonal biotinilado obtenido en cabra contra la fracción constante de las inmunoglobulinas del conejillo de indias a una concentración 1:200 (Vector Laboratories, cat. No. BA-7000) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras varios lavados en PB se procedió a



revelar la localización de los anticuerpos con el kit ABC que por medio de la reacción con DAB y glucosa oxidasa produjo depósitos de color marrón, en la misma localización del anticuerpo y por tanto constituyendo la señal indirecta de los lugares de localización del VGluT2 en el tejido.

#### 4.7. Series de visualización del marcado obtenido con trazadores retrógrados

Las secciones de la serie en la que se iba a visualizar los somas marcados retrógradamente fueron montadas en portaobjetos gelatinizados justo después de su corte. Los cortes se dejaron secar en oscuridad y a continuación se lavaron las sales de la solución de montaje con un paso rápido por agua destilada. Posteriormente, las secciones en los portaobjetos fueron deshidratadas, desengrasadas y cubiertas como se describió anteriormente. Después de cubrir los portaobjetos se mantuvieron en oscuridad para reducir el fotoblaqueamiento de la emisión de los trazadores fluorescentes, hasta el momento de su análisis con el microscopio de epifluorescencia.

### 5 ANÁLISIS DEL MATERIAL

Las series de material histológico obtenido fueron visualizadas con objetivos Nikon de gran apertura numérica utilizando un microscopio Nikon Eclipse 600. Obtuvimos fotografías de alta resolución en formato .tiff utilizando una cámara digital unida al microscopio (DMX 1200) que estaba controlada por el software NIS (v3.22.15 Nikon, Japón). En caso de ser necesario, realizamos imágenes en mosaico con el módulo incluido en el NIS que realizaba composiciones con imágenes de campos adyacentes que fueron alineadas cuidadosamente y fusionadas creando una imagen de todo el campo. Para ello el programa NIS se vale de una platina motorizada acoplada al microscopio (Proscan II, Prior Scientific Instruments, Cambridge, R.U.) que es controlada por él.

Las fotomicrografías obtenidas fueron importadas en el programa de imagen y dibujo vectorial Canvas XV (ACD Systems, E.E. U.U.) y sobre ellas se realizó el delineado de los contornos de los núcleos en tálamo y se dibujó la localización de las neuronas marcadas retrógradamente en tálamo.

### 5.1. Delimitación de las subunidades del complejo pulvinar

Para cada caso, los límites de las subunidades del complejo pulvinar y los núcleos adyacentes fueron dibujados ayudándonos de las series paralelas en cada caso, teñidas con AchE, Nissl y CyO. Para algunos límites nos guiábamos también con el atlas de tití común de Paxinos et al. 2012. Sin embargo, algunos límites no se ajustaban a lo que observábamos de visu en las tinciones obtenidas, sobre todo el límite entre PulM y PulL. Por ello, para estos límites hemos modificado la delimitación propuesta. En algunos casos se realizó la inmunohistoquímica contra VGlut2 para mejorar la delimitación de los componentes del pulvinar inferior con mayor expresión de esta proteína (centromediano y posterior).

Para superponer los límites que se apreciaban en cada tinción, alineamos las secciones adyacentes guiándonos de estructuras que se extendían en varios niveles como los contornos de grandes vasos sanguíneos y accidentes del tejido. Utilizamos las delimitaciones de los núcleos del complejo pulvinar para superponerlas a las imágenes del centro de los depósitos de BDA y a las imágenes de fluorescencia con las neuronas marcadas retrógradamente dibujadas.

### 5.2. Análisis de los axones marcados con trazado anterógrado

Para localizar el nivel anteroposterior y la posición en la que se encontraba el centro del depósito, reconocible por la marca de entrada de la pipeta, se superpuso el nivel donde se apreciaba con las secciones de las series adyacentes en las que se había realizado la delimitación. Además, se asignó el nivel de la inyección a la lámina de referencia del atlas que le correspondía y se dibujó la forma del depósito en ella para permitir comparaciones con el resto de depósitos.

#### 5.2.1. Análisis cualitativo

(1) Reconstrucciones de la extensión tangencial de los axones marcados con BDA sobre los mapas planos de la superficie cortical

Para producir una visión global de la distribución tangencial de las ramificaciones axonales, marcadas anterógradamente, a lo largo de toda la neocorteza realizamos reconstrucciones de su distribución tangencial.

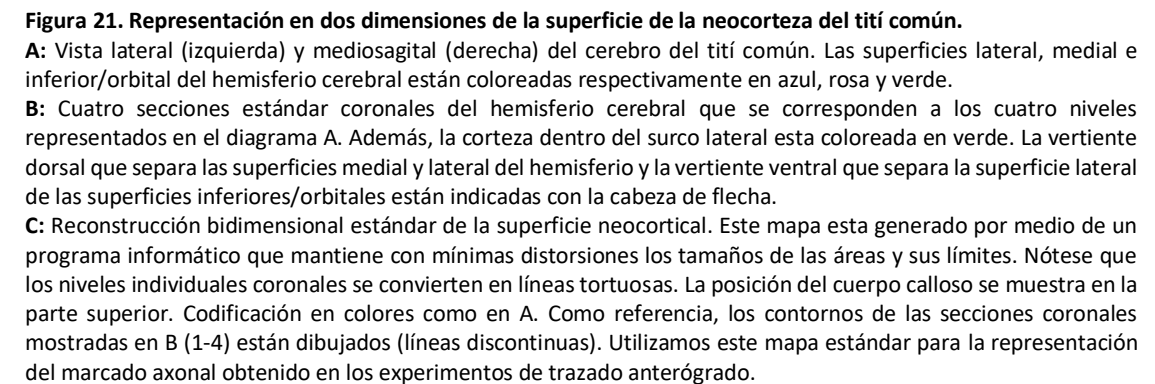
Utilizamos la reconstrucción bidimensional de la superficie cortical estándar publicada en el atlas de tití común de Paxinos et al. 2012. Este mapa es una generación en dos dimensiones de un modelo de baja distorsión de toda la superficie cortical de un hemisferio. Fue realizado con el programa Caret (<http://brainvis.wustl.edu/wiki/index.php/Caret>About>), creado por el laboratorio de Van Essen, a partir de todos los contornos de los diagramas coronales del atlas. El

mapa también muestra los límites de las áreas corticales y los contornos piales de cada sección, que se observan como líneas tortuosas que se disponen de forma paralela entre sí a una distancia de 500µm. Aprovechamos que la superficie pial estaba dibujada en el mapa para representar a lo largo de ella la localización y densidad relativa de los axones marcados en cada una de las secciones de BDA. En la **Figura 21** representamos la posición de 4 niveles coronales equidistantes a lo largo del hemisferio del animal, en el apartado A observamos cómo se verían estos niveles en el cerebro completo, en B cómo se observan en cortes coronales y en C se representa el contorno pial en líneas discontinuas con las distintas partes que conforman el contorno (superficie lateral y medial) representadas sobre la reconstrucción bidimensional de la corteza. En C observamos el mapa que utilizaremos en todas las reconstrucciones tangenciales, con los límites de las áreas dibujados, hemos señalado hitos interesantes como son el surco lateral (único surco que presenta el cerebro casi lisencefálico del tití común) y los componentes del surco calcarino en el lóbulo occipital.

Primero, emparejamos cada sección de BDA con la sección del atlas que más se le aproximaba por hitos anatómicos, es decir, aparición de la comisura blanca anterior, comienzo del tálamo, comienzo del núcleo geniculado lateral, etc. Esto lo realizamos en todas las secciones para tener asignada toda la serie de BDA a lo largo del hemisferio con las láminas del atlas que les corresponde.

Posteriormente, las arborizaciones axonales en cada sección fueron representadas de una forma altamente simplificada a lo largo de la línea del contorno pial correspondiente (como puntos que representan una proyección radial del marcado sobre la superficie pial).

El espaciado entre los puntos y su número fue utilizado para indicar las variaciones en la densidad de las arborizaciones. Utilizamos diferentes colores para representar el marcado localizado en capa 1 (puntos verdes) y el que estaba localizado en el resto de capas (puntos rojos). Este proceso fue iterado para cada sección con marcado de BDA en cada caso en el que obtuvimos un depósito válido en el complejo pulvinar.



En algunos niveles representativos se realizó la reconstrucción de toda la sección. Utilizando el objetivo de 4X se realizó un mosaico de todo el corte para dibujar los contornos

generales en el programa de dibujo vectorial Canvas XV. Los axones, sus parches y principal recorrido por sustancia blanca fue reconstruido en cámara clara usando un objetivo 10X. Las regiones dibujadas con cámara clara fueron superpuestas en el mosaico realizado a 4X, usando como guía marcas del tejido como vasos sanguíneos y límites de estructuras presentes. A continuación, los axones y los bordes del tejido fueron redibujados en Canvas XV para obtener una reconstrucción del recorrido de los axones.

### 5.2.2. Análisis cuantitativo

#### (1) Estimaciones estereológicas del número de varicosidades axonales

##### (a) Fraccionador óptico

Para las estimaciones estereológicas, utilizamos un programa informático con un paquete estereológico integrado (NewCast, Visiopharm, Horsholm, Dinamarca) en un ordenador de dos monitores que estaba asociado a un microscopio Olympus BX61 equipado con un microcator Heidenhain MT-12 (0,5µm de resolución), una platina motorizada de alta precisión que se podía mover en los tres ejes del espacio (ProScan II, Prior scientific, Cambridge, R.U.) y una cámara digital DP-70 (Olympus, Tokio, Japón).

En cada caso, se eligieron tres secciones consecutivas dentro de la misma área cortical que tuvieran la zona del parche de marcado con mayor densidad. De forma que, muestreábamos en la zona de corteza que recibía la mayor cantidad de inervación desde las neuronas marcadas con BDA en MPul dibujando un contorno en forma de columna (transecto).

Estos tres transectos se realizaron también en las mismas áreas de dos casos más (n=3). Se analizaron un total de 3 regiones corticales con marcado axonal representativo: las cortezas ventrolateral, temporal inferior y parietal posterior. Los transectos fueron dibujados a 4X en el programa NewCast, primero dibujábamos todo el transecto con una anchura de 200µm. Siempre buscábamos que el transecto siguiera la orientación radial del parche; esto causó que en los parches de corteza prefrontal tuviéramos que orientar el transecto para que siguiera la curvatura radial que presentaban los parches en estas cortezas. A continuación, la altura del transecto se dividió en 20 partes iguales de forma que quedó formado por 20 rectángulos iguales. Estos rectángulos se denominaron BINes y constituyeron las regiones de interés sobre las que se realizaron las estimaciones estereológicas. Al dividir los transectos por la altura de cada región cortical se homogenizan los datos de forma que las áreas que tengan mayor altura debido a la oblicuidad del corte (corteza prefrontal) tienen BINes mayores.

Para estimar el número absoluto de varicosidades axonales ( $\hat{N}_{var}$ ) por BIN en cada transecto utilizamos un esquema de fraccionador óptico (West et al. 1991). En este esquema se obtiene, con muestreo sistemático uniforme con inicio al azar, de una fracción asequible aplicando fracciones sucesivas. En el último nivel de fraccionamiento, se utiliza una sonda insesgada de tres dimensiones (el disector óptico) en el que se realizará el recuento de las varicosidades. El disector nos permite realizar una estimación insesgada gracias a que está compuesto por lados de inclusión y exclusión. Las fracciones utilizadas son las siguientes:

- Fracción de muestreo de secciones (fss): este nivel se obtiene al realizar el corte sistemático para obtener series de cortes. En nuestro caso esta fracción no está presente ya que nuestra región de interés, el transecto, está contenida en un corte.
- Fracción del área de la sección estudiada (asf): es el área muestreada tras superponer sobre la región de interés una retícula formada con disectores separados a una distancia equidistante, este muestreo se realiza en forma de meandro; una opción presente en el paquete informático del NewCast. Esta fracción la calculamos como el área del disector dividido por el producto de la distancia en el eje x (dx) y en el eje y (dy) entre un disector y el siguiente.
- Fracción de muestreo en altura (hsf): es la cantidad de tejido en el grosor del corte que es muestreado por los disectores, se calcula dividiendo a la altura del disector el grosor ponderado por las partículas del corte. El grosor ponderado del corte se calcula con la fórmula de Bermejo et al. (2003) que busca limitar el sesgo en la estimación de la N debido a la variabilidad en el grosor de las secciones producidas por el corte en congelación y el procesamiento histológico. Para calcular este parámetro realizamos varias mediciones del grosor del tejido con el microcator, obteniendo una media que fue ponderada por el número de varicosidades contadas en cada BIN.

Las unidades de recuento fueron las varicosidades, que se observaban perfectamente a 100X en un medio de aceite de inmersión en los axones marcados anterógadamente con BDA. Consideramos como varicosidad los engrosamientos axonales que doblaban la anchura media de los segmentos axónicos inmediatos, además incluimos las varicosidades terminales que tenían la forma característica con un cuello y cabeza. En cambio, no se consideraron como varicosidades los recodos que producían los axones al cambiar de dirección, ni los engrosamientos que estaban en el punto de la ramificación. Tampoco incluimos en el recuento los engrosamientos borrosos

o que no se podían distinguir debido al solapamiento de varias fibras en las regiones de plexos muy densos. La última situación se produjo en momentos muy aislados a lo largo del recuento. Tras estas definiciones, se realizó el recuento de las varicosidades dentro de los disectores que cumplían con los criterios de inclusión. Este número referido en estereología como impactos ( $\Sigma Q^-$ ), fueron multiplicados por la inversa de las fracciones para obtener la estimación del número absoluto de las varicosidades  $\hat{N}_{Var}$  contenidas en los BINes.

A continuación, queremos hacer hincapié en algunas características de nuestro abordaje estereológico. Primero, en un esquema de fraccionador no es necesario conocer el volumen del espacio de referencia. Sin embargo, es indispensable conocer las fracciones que se han utilizado y que no se pierdan secciones durante el muestreo sistemático. Segundo, para evitar el sesgo de que el volumen del disector se extienda más allá del borde inferior de la sección y de esta forma se produzca una subestimación del  $\hat{N}_{Var}$ , se confina el disector óptico en la parte superior de la sección dejando siempre una zona de seguridad para evitar el efecto de pérdida o truncamiento de las partículas en el borde el tejido (Andersen y Gundersen 1999). En nuestro caso utilizamos secciones cortadas con un grosor de 40 $\mu$ m, este grosor en fresco sufre una drástica deformación y disminución debido al procesamiento histológico. Llegando a presentar un valor medio alrededor de 12 $\mu$ m al realizar las mediciones con el tejido procesado histológicamente in situ con el microcator. En la **Tabla 6** se recogen los parámetros utilizados en la estimación estereológica.

**Tabla 6. Parámetros estereológicos utilizados**

Altura del disector	Zona de seguridad	Área del disector	D(x)*D(y)	Grosor medio de los cortes
8 $\mu$ m	2 $\mu$ m	594,24 $\mu$ m <sup>2</sup>	60*60 $\mu$ m <sup>2</sup>	12 $\mu$ m

Con las estimaciones en los tres casos (suma de los tres transectos en cada caso) en cada BIN se obtuvieron las medias con su desviación estándar de la media (SEM). Representamos las medias con polígonos de frecuencias a lo largo del transecto, de esta forma podemos apreciar cómo varía el perfil de la distribución del número de varicosidades a lo largo del grosor cortical.

Tras dibujar los transectos a 4X en el programa NewCast exportamos la imagen del parche con el contorno del transecto en formato .jpg. Esta imagen superpuesta en el programa Canvas con la imagen de la tinción de Nissl que le corresponde, nos ha permitido delimitar las capas corticales en el transecto, posibilitando que seamos capaces de distribuir los BINes y sus valores en las capas corticales que les corresponde. Con los datos de  $\hat{N}_{Var}$  por capa cortical

normalizamos cada caso con su número total obteniendo la distribución en porcentajes por capa y a continuación calculamos las medias para los tres casos con su SEM.

Otros datos que nos parecieron interesantes fueron los valores de densidad por capa, para ello dividimos los valores de número de varicosidades por el volumen de BINes que se localizaban en cada capa cortical. Los datos de densidad por capa fueron normalizados por la densidad total de forma que obtuvimos ratios que nos permitieron hacer comparaciones de la variación de la densidad entre las diferentes capas.

#### (b) Estimación del coeficiente de error

Para calcular la precisión de las estimaciones estereológicas, se calculó el coeficiente de error (CE) debido al método de muestreo. Se realizó según las ecuaciones de Gundersen et al. 1999 y Bermejo *et al.* 2003. El coeficiente de error para el número de absoluto de varicosidades ( $CE_{\hat{N}_{var}}$ ) se calculó usando la **Fórmula 1** y está compuesto por dos términos independientes: la varianza de las varicosidades que se contaron en cada transecto y la varianza debida al muestreo sistemático al azar.

$$CE_{\hat{N}_{var}} = \sqrt{\alpha(\tau) \frac{\sum Q^- + [3(A - Nugget) - 4B + C]}{\sum Q^-}}$$

**Fórmula 1. Estimador de Matheron-Gundersen-Jensen (MGJ) modificado por Cruz-Orive 1999**

Siendo  $A = Q_i * Q_i$ ,  $B = Q_i * Q_{i+1}$ ,  $C = Q_i * Q_{i+2}$ ,  $\alpha(\tau)$  una constante cuyo valor puede oscilar entre 1/12 (para objetos irregulares) y 1/240 (para objetos esferoidales) al ser las varicosidades de forma ovalada se tomará el último valor. El Nugget es la variabilidad a corta distancia que puede deberse a la existencia de discontinuidades o a la alta irregularidad entre secciones adyacentes del objeto bajo estudio; se corresponde con el  $\sum Q^-$ .

Se calcularon los  $CE_{\hat{N}_{var}}$  para las estimaciones por área y la media de los tres casos experimentales analizados.

#### (2) Mediciones del tamaño de las varicosidades axonales

Decidimos realizar estas mediciones ya que nos llamó la atención observar en los campos terminales a 100X varicosidades de distinto tamaño. Como una aproximación a la distribución y tamaño medio de los botones axonales, realizamos las mediciones de las áreas de máxima de proyección de las varicosidades (realizado en otros estudios: Marion et al. 2013, Viaene et al.



2011) en las capas 1 e intermedias (3b y 4) de los parches en los que se habían realizado las estimaciones estereológicas (en regiones de las cortezas parietal, temporal y prefrontal).

Los perfiles de los botones se dibujaron en cámara clara (Nikon Y-IDT) acoplada a un microscopio Nikon Eclipse E400, con un aumento de 100x en un objetivo de inmersión en aceite (Nikon 100x-Apertura numérica: 1.25), utilizando una mina de grafito de 0,5 mm para obtener un trazo homogéneo.

Dibujamos los contornos de las varicosidades dentro de regiones que habíamos definido previamente realizando un muestreo de todo el parche de marcado axonal al azar. Tratamos de realizar las mediciones en toda la extensión de parche, tanto en el centro como la periferia. Para evitar que se midieran los mismos botones después de dibujar una región en una zona, esta sección no volvía a ser muestreada posteriormente.

Los contornos que habíamos dibujado fueron escaneados (Escáner, Epson Stylus BX610) en alta resolución y redibujados en Canvas XV, donde se midió el tamaño del área de proyección en micras cuadradas. Los límites de resolución con una magnificación y apertura numérica parecida a la nuestra fueron calculados en un trabajo previo (Viaene et al. 2011a) dando un valor cercano a las  $0,3 \mu\text{m}^2$ . Por eso excluimos cualquier varicosidad con un tamaño por debajo de  $0,2 \mu\text{m}^2$ . Estos datos se exportaron a una tabla de Excel donde fueron posteriormente ordenados en intervalos por cada animal. Finalmente calculamos las medias y SEM de los intervalos con los datos de los tres casos analizados.

Utilizamos dos tipos de representaciones gráficas de las poblaciones. Por un lado, obtuvimos histogramas de la distribución media del tamaño de botones por área y en capas 1 e intermedias junto con sus SEM. Por el otro, representamos las poblaciones con gráficos de cajas y bigotes, que resultan muy útiles ya que muestran en un solo gráfico exploratorio gran cantidad de información descriptiva de las distribuciones (Krzywinski y Altman 2014; Nuzzo 2016). Como son sus medianas (línea central en la caja), la dispersión del 50% de los datos alrededor de la mediana (rango intercuartil entre los percentiles 25 y 75 de los datos, representado como una caja), los datos extremos (los datos que se extienden 1,5 veces más del rango intercuartil por encima y debajo) y por último, los datos raros (representados por puntos). Además, facilita la comparación en un solo vistazo de las distribuciones (permitiendo la comparación visual de sus medianas y dispersión, por ejemplo).

De estos datos realizamos el análisis estadístico en el paquete estadístico SPSS versión 24 (IBM, E.E. U.U.) entre las capas analizadas y las regiones prefrontal, parietal y temporal. Para

todos los test estadísticos realizados, consideramos el resultado significativo si obtenemos un P-Valor menor a 0,05 (\* P-Valor [0,05-0,01]; \*\* P-Valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\* P-Valor 0). Primero realizamos la comprobación de la normalidad de las distribuciones con la prueba de Shapiro-Wilk. En todos los casos la prueba resultó significativa, lo que indica que las muestras no siguen una distribución normal y por tanto es necesario aplicar pruebas no paramétricas.

A continuación, contrastamos las distribuciones entre las áreas y capas analizadas. Para ello, analizamos la bondad de ajuste de las distribuciones aplicando el método no-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras independientes. Este método fue desarrollado por Smirnov (1936) a partir de los trabajos de Kolmogorov (1933); se basa en la comparación entre las frecuencias acumuladas de dos distribuciones (Revisado en Sheskin 2003). De forma que, si hay cualquier punto con diferencias significativas a lo largo de las frecuencias acumulativas de las distribuciones, se puede afirmar con bastante seguridad que las muestras vienen de dos poblaciones diferentes. Las comparaciones que resultaron significativas para este análisis estadístico fueron señaladas con asteriscos en los histogramas de distribución de las varicosidades.

Finalmente, realizamos el contraste estadístico de las medianas de las poblaciones para las distintas capas y áreas por medio del test no paramétrico para muestras independientes de la U de Mann-Withney. Las comparaciones que resultaron significativas fueron señaladas con líneas y con asteriscos se indicó su grado de significación.

### 5.3. Análisis de los somas marcados retrógradamente en el complejo pulvinar

#### 5.3.1. Análisis con el microscopio de epifluorescencia

Para este bloque de análisis, examinamos la serie reservada para tal fin en el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse que estaba equipado con los bloques de filtros adecuados: B-2A con un espectro de excitación entre los 450-490 nm adecuado para la visualización de las Alexa Fluor 488, UV2A con un espectro de excitación entre 330-380 nm indicado para la visualización del FB (longitud de onda de excitación: 365nm) y el G-2A que presenta un espectro de excitación entre 510-560nm permitiendo la visualización de las Alexa Fluor 594.

Se procedió a realizar fotomicrografías, utilizando la cámara (DMX 1200) acoplada al microscopio que estaba controlada por el programa NIS, de las secciones corticales que contenían el centro del depósito retrógrado en corteza y se realizaron reconstrucciones radiales

de cada uno en la corteza (los casos que produjeron contaminación en sustancia blanca fueron eliminados del análisis) y de su expansión tangencial sobre los mapas planos de corteza.

A continuación, se realizaron mosaicos de la totalidad del tálamo, de las secciones coronales de PulM que tenían somas marcados, a 4X con el filtro B-2A para obtener fotografías de todo el corte que permitían apreciar los límites generales del corte para realizar parte de la delimitación de algunos núcleos y los tractos de fibras. Las regiones dentro del PulM que tenían somas marcados fluorescentemente fueron fotografiadas con un objetivo Nikon 10X con alta apertura numérica, usando el bloque de filtros adecuado y en los casos en que se necesitara, realizamos mosaicos para tener fotos en alta resolución de todos los somas marcados. Estas imágenes tomadas a 10X, fueron importadas al Canvas y superpuestas a las imágenes de la misma sección tomadas a menor aumento (4X) que contenían todo el tálamo. Las secciones anteriores junto con las series adyacentes que tenían otras tinciones (Nissl, AchE y VGluT2) fueron alineadas utilizando vasos y otros accidentes para ello. A continuación, procedimos a dibujar, con ayuda del atlas de Paxinos et al. (2012) de tití común, los límites de los componentes del complejo pulvinar y los núcleos adyacentes. Finalmente, se representó la localización de los somas marcados en tálamo con círculos. Para evitar confusiones estos círculos siempre fueron azules, verdes y rojos para representar los somas marcados con FB, CTB-verde y CTB-rojo respectivamente.

Para realizar comparaciones entre animales, las secciones de casos seleccionados fueron ubicados en la sección estándar coronal del atlas de Paxinos et al. (2012) que les correspondía y se realizó una alineación aproximada del corte con la figura del atlas. Por último, los somas marcados fueron transferidos a las secciones estándar. Este paso se realizó en todos los animales con depósitos en corteza y las combinaciones que permitían observar una posible organización de las proyecciones dentro del núcleo fueron seleccionadas para representarlas juntas.

### *5.3.2. Análisis de la colocalización con el microscopio confocal*

En los casos que presentaban depósitos retrógrados simultáneos realizamos los pasos relatados anteriormente con el microscopio de epifluorescencia, una vez que teníamos dibujada la localización de los somas marcados en tálamo podíamos apreciar si se producía solapamiento entre los focos de somas de proyección marcados con distintos colores. Cuando localizábamos zonas en las que había mucho solapamiento, analizamos de visu intercambiando los filtros rápidamente si podían tratarse de neuronas con doble marcado. En los casos que teníamos dudas utilizamos el microscopio confocal para asegurarnos el análisis de la colocalización.

El análisis fue realizado en un microscopio confocal (Leica TCS-SPII) utilizando las líneas de láser argón 364nm y 543nm. Utilizando el objetivo de 63X obtuvimos pilas o “stacks” de imágenes de 1µm de grosor en el eje Z en las regiones de solapamiento. Posteriormente, alineamos las fotos por canal de emisión de cada sección óptica del “stack” y observamos cuidadosamente la colocación de neuronas. Además, para mejorar la visualización de los datos cambiamos el color de las imágenes de FB que pasaron de ser de color azul al color verde, de esta forma comparábamos imágenes en rojo y verde que son colores que al presentar colocación en una célula producen un color amarillo fácil de identificar.

**Tabla 7. Casos analizados con los trazadores inyectados y su localización en cada hemisferio.**

Caso	Depósito de trazador anterógrado	Depósitos corticales de trazadores retrógrados			
	BDA 10%	FB 1%	CTB 2%	CTB-rojo 1,5%	CTB-verde 2%
	Localización				
04dx	PulA				
04izq	PulM				
11dx	PulM				
11izq	PulM				
12dx	PulM				
12izq	PulM				
13dx	PulM				
13izq	PulM				
14dx	PulL				
14izq	PulL			PrefVent (45 y 47L)	ParPost (PFG)
15izq	PulL	Temporal superior		ParPost	PrefVent
17dx		PrefVent (47L y ProM)		ParPost (PFG y PG)	
17izq	PulL	PrefVent (47L y ProM)		ParPost (AIP y LIP)	
18izq		ParPost (PFG, PG y LIP)		PrefVent (45, 6Vb y 6Va)	
19dx	Mpul				
19izq		Temporal Inferior (TemplInf) (TE3, TEO, TE2)		PrefVent (45)	
20izq	PulL	TemplInf (TE3, TEO, TE2)		ParPost (AIP)	
21dx	PulM				
21izq	PulM	TemplInf (TE3 y FST)		ParPost (LIP)	
22dx	PulM				
22izq	PulM				
23izq		ParPost (PE)			
24izq		TemplInf (TE3)			
25izq		TemplInf (TE3)			
26dx	Parietal posterior (ParPost)	ParPost	PrefVent		
27dx	Prefrontal ventrolateral (PrefVent)	ParAnt	PrefVent		
29dx		TemplInf (TE2 y TE3)			

## **IV. RESULTADOS**

Los experimentos realizados han tenido como finalidad el estudio de la distribución cortical de las conexiones desde un núcleo talámico asociativo en primate: el núcleo pulvinar medial; y el estudio de la posible organización topográfica de PulM respecto a las regiones corticales inervadas. Para ello hemos usado una técnica altamente sensible como es el trazado anterógrado de las conexiones talamocorticales por medio de depósitos restringidos de BDA.

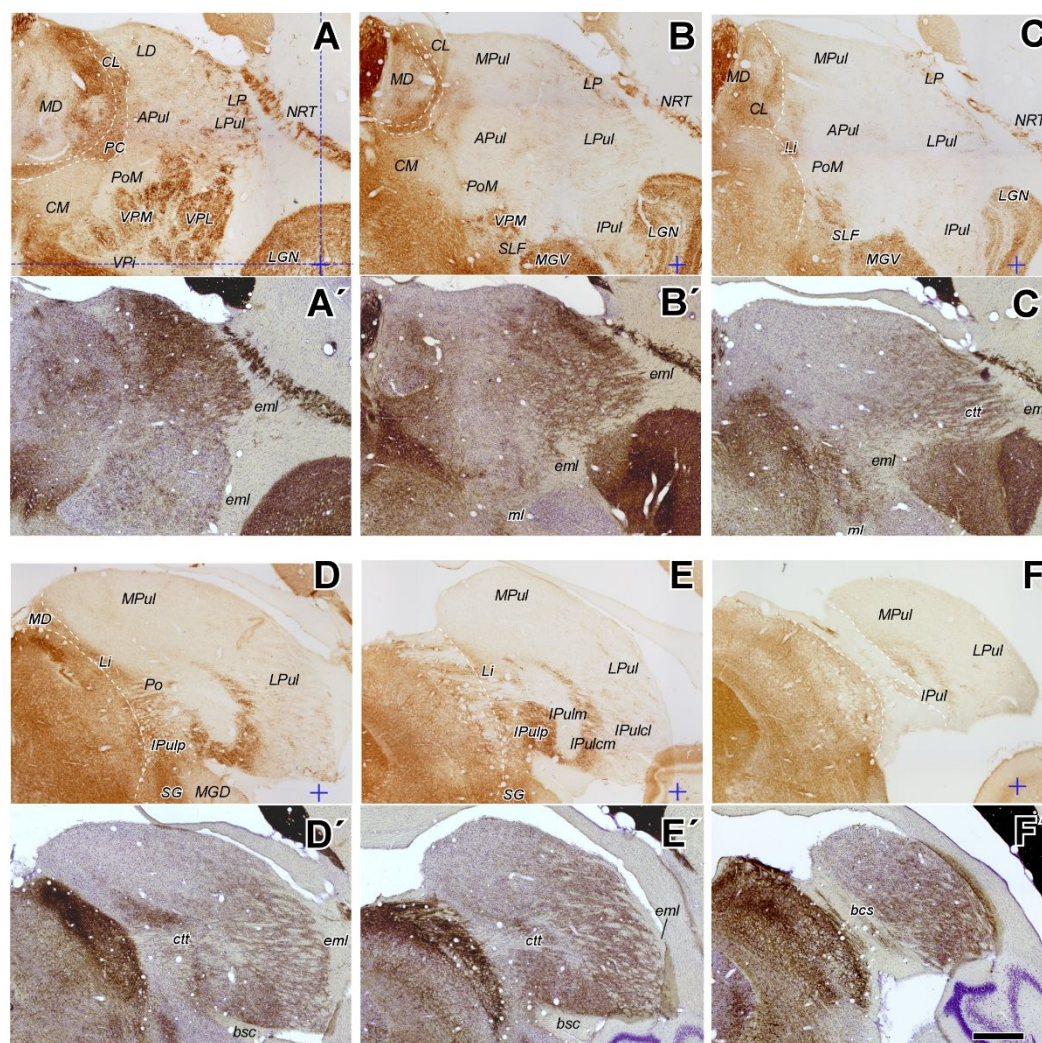
En primer lugar, mostraremos los datos de la distribución de los axones TC marcados en distintas áreas de la corteza. Estos datos se presentan resumidos en mapas planos de la superficie cerebral del tití común (Paxinos et al. 2012) de forma que se puede ver en una simple imagen todas las áreas inervadas desde un depósito en PulM. De estos casos, se presentará la reconstrucción del patrón de inervación en algunas secciones coronales, representativas del caso, y se mostrará la reconstrucción laminar de los axones TC marcados en algunas áreas corticales inervadas. Además, con fines comparativos mostraremos la distribución tangencial de casos con depósitos localizados en PulL y PulA.

A continuación, realizamos el análisis cuantitativo de estas conexiones, que consistió en la estimación del número de botones en los parches de axones marcados con mayor intensidad y por último realizamos mediciones del tamaño de las varicosidades axónicas.

El segundo bloque de datos está constituido por los experimentos de trazado axonal retrógrado. Guiándonos con los resultados de marcado anterógrado nos centramos en tres regiones corticales que recibían de forma consistente inervación desde una región pequeña de PulM rostral. Los depósitos se realizaron en regiones de las cortezas prefrontal ventral (PrefVent), parietal posterior inferior (ParPost inf) y temporal inferior (TempInf). La localización de los somas marcados dentro del núcleo para cada depósito cortical nos permitió inferir parte de la topografía de las proyecciones TC en PulM; y en animales que recibieron dos depósitos simultáneos se buscó la existencia de neuronas marcadas por ambos trazadores para explorar si una misma neurona puede inervar, por medio de colaterales distintas áreas corticales.

## **1 DELIMITACIÓN DEL NÚCLEO PULVINAR MEDIAL**

Debido a que los límites del núcleo PulM son variables según los distintos autores, realizamos una inmunohistoquímica frente VGLUT2 a lo largo de toda la serie de tálamo para ayudar a fijar los límites de PulM. También usamos la tinción de Nissl e histoquímica para la actividad de AChE.



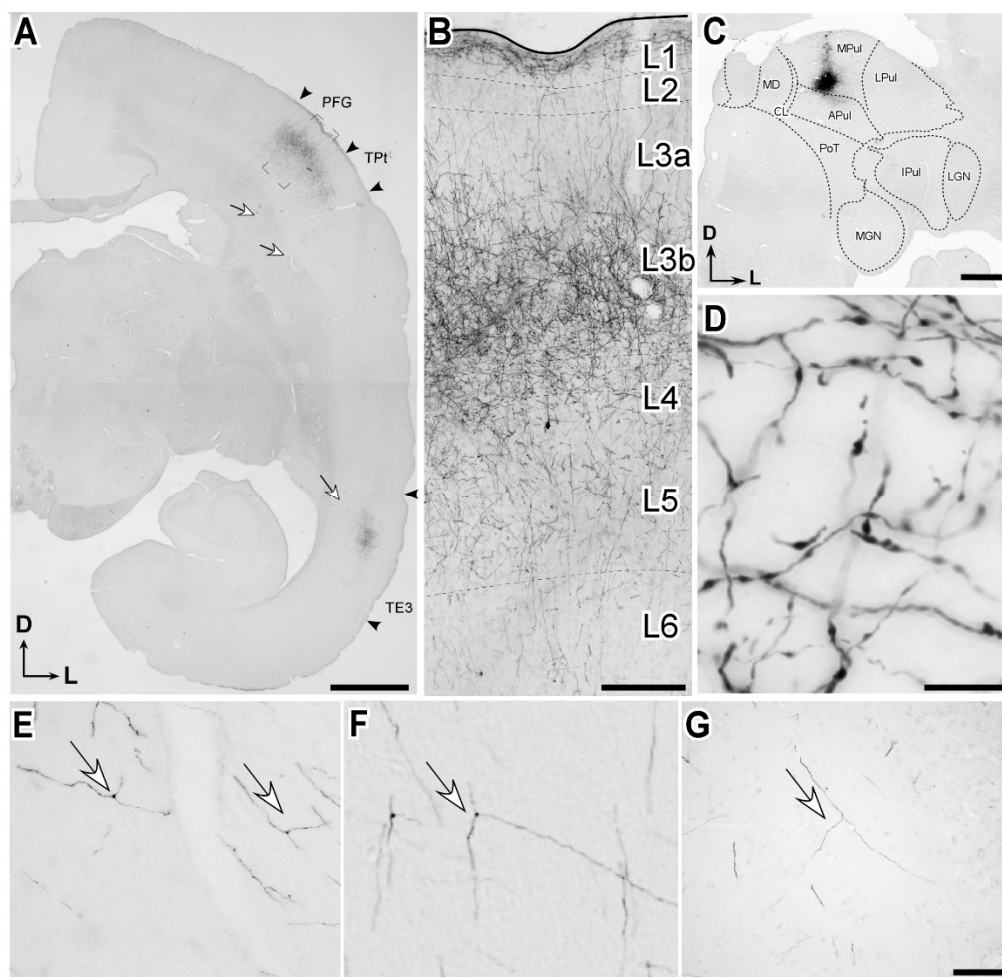
**Figura 22. Delimitación inmunohistoquímica del complejo pulvinar.**

Progresión rostro-caudal de secciones coronales del mismo caso en la que se observan en dos series adyacentes la distribución de VGLUT2 (A-F) y la tinción de Nissl superpuesta a la histoquímica contra la enzima AcE (A'-F'). Las líneas representadas en A indican la distancia medio-lateral (7mm, vertical) y la distancia dorso-ventral respecto al plano formado por la línea interaural y al reborde orbitario inferior (9,5mm, horizontal), la cruz en los siguientes niveles representa el punto en el que se encuentran ambas coordenadas. La serie con VGLUT2 nos permite diferenciar los núcleos dorsomediano (DM), lateral posterior (LP), limitans (Li), supragenicular (SG) y los componentes centromediano (Pulcm) y posterior (Pulp) del pulvinar inferior. La técnica de AcE nos permite distinguir el límite aproximado entre PulL y PulM. Barra de calibración:2mm. Otras abreviaturas (cf. Lista de abreviaturas).

En la **Figura 22** observamos fotomicrografías de distintos niveles del PulM, en la fila superior se encuentran las secciones en las que se realizó la inmunohistoquímica para VGLUT2 (**Figura 22 A-F**), en la inferior se observan secciones con la tinción de Nissl superpuesta a la histoquímica para la actividad de la enzima AchE (**Figura 22 A'-F'**). MPul se caracteriza por presentar una inmunoreactividad frente a VGLUT2 (ir-VGLUT2) muy escasa o nula, lo que permite diferenciarlo de otros núcleos talámicos que presentan mayor inmunoreactividad. Anteriormente queda limitado por el núcleo LD, que presenta parches heterogéneos de ir-VGLUT2. Inferiormente



queda limitado por PulA, que, aunque también presenta una pobre ir-VGLUT2, una delgada lámina de ir-VGLUT2 separa ambos; en regiones más caudales la elevada ir-VGLUT2 de algunos subnúcleos de Pull: centromedial y posterior, que según la bibliografía reciben numerosas aferencias subcorticales desde el colículo superior. En concreto la extensión dorsal de Pullcm permite limitar la región ventral de PulM en la mitad caudal del núcleo. Medialmente el límite de PulM queda marcado por la elevada ir-VGLUT2 en núcleos como MD, CL y Li. Lateralmente está situado Pull, con el que no se encuentran diferencias significativas de ir-VGLUT2, por lo que para definir este límite usamos la mayor actividad AChE en Pull.



**Figura 23. Resolución del marcado de los axones TC tras realizar depósitos restringidos de BDA en PulM.**

Composición de fotomicrografías que muestran en detalle el marcado anterógrado de los axones en el caso 04izq.

**A:** Foto de una sección coronal a 1,2x en la que se aprecian dos parches de axones marcados con BDA en corteza parietal posterior (PFG y TPT) y en corteza temporal inferior (TE3).

**B:** Ampliación del parche parietal señalando los límites de las capas corticales; obsérvese que, a simple vista, el grueso de la innervación parece estar dirigido a dos focos. El primero en la parte inferior de la capa 3 y capa 4 y el segundo en capa 1.

**C:** Detalle a 4x de la sección coronal que presentaba el centro del depósito en PulM.

**D:** Fotomicrografía usando un objetivo de 100X en un medio de aceite de inmersión que nos permite ver los engrosamientos axonales o varicosidades con gran definición.

**E-G:** Detalle de las ramificaciones axonales observadas en la parte profunda de la sustancia blanca. Barras de calibración: A y B: 1mm, c:300µm, D, F, G:100µm, E: 50µm.

Estos datos nos llevaron a redefinir de forma tentativa algunos de los límites representados en el atlas de tití común de Paxinos et al. 2012, especialmente el límite entre PulM y Pull

## 2 EXPERIMENTOS DE TRAZADO ANTERÓGRADO POBLACIONAL

Obtuvimos 13 casos válidos de depósitos de BDA localizados en PulM. También se realizó el análisis de 4 casos que localizados en Pull y uno en Pula con fines comparativos. El marcado de los axones TC (cf. **Figura 23**) fue de gran calidad lo que nos permitió estudiar con gran detalle los axones y elementos más pequeños como los engrosamientos axonales o varicosidades, considerados como elementos putativos a contactos sinápticos; y otros elementos como las ramificaciones axónicas. Además, el corte seriado nos proporcionó un número de secciones equidistantes de toda la corteza, permitiéndonos realizar reconstrucciones detalladas de la distribución de los axones marcados en toda la superficie cortical.

### 2.1. Localización de las inyecciones analizadas

Para facilitar la comparación entre casos, en la **Figura 24** se representa el centro de inyección de todos los depósitos en los dibujos coronales de tálamo del Atlas de Paxinos. En base a nuestras tinciones hemos realizado modificaciones de la delimitación propuesta por el atlas. Para facilitar el análisis, agrupamos los casos en función de su patrón mayoritario de proyecciones; nótese que cada patrón de distribución tangencial que obtuvimos era esencialmente distinto ya que las inyecciones nunca incidieron exactamente en la misma posición y afectaron a la misma cantidad de células en los diferentes casos, sin embargo, se puede intuir un patrón general común entre ellos.

De esta forma el color azul codifica para los casos que inervan de forma consistente regiones en las cortezas prefrontal ventral, parietal posterior y temporal inferior. Estos depósitos (casos 11dx, 11izq, 13dx, 13izq y 12izq) se encuentran en una posición intermedia del núcleo respecto al eje anteroposterior y el eje mediolateral. La gran mayoría tienen un aspecto filiforme extendiéndose dorsoventralmente en el núcleo. Observamos que el caso 04izq se sale de este patrón estando localizado más rostral, ventral y en una región ligeramente más próxima al límite con el núcleo dorsomediano.

Los casos marcados en color verde se corresponden con los depósitos restringidos a la corteza temporal inferior y/o ventral. Son casos localizados en los niveles caudales en el tercio central del núcleo respecto al eje de la línea media; al ser filiformes también se encuentran abarcando una gran región dorso-ventral del núcleo.

En color rosa se encuentran representados los depósitos con un patrón de proyecciones restringido a cortezas occipitales. Estos depósitos se encuentran dentro del límite de PulL, sin embargo, es preciso diferenciar entre los casos más mediales (casos 14dx, 20izq y 14izq) de los casos más laterales (casos 15L y 19L). Los casos mediales al estar cerca del límite entre PulL y PulM se encuentran en una región de transición, por lo que el patrón de conexiones podría ser diferente al de los casos laterales, que probablemente, reflejen un patrón más representativo del PulL.

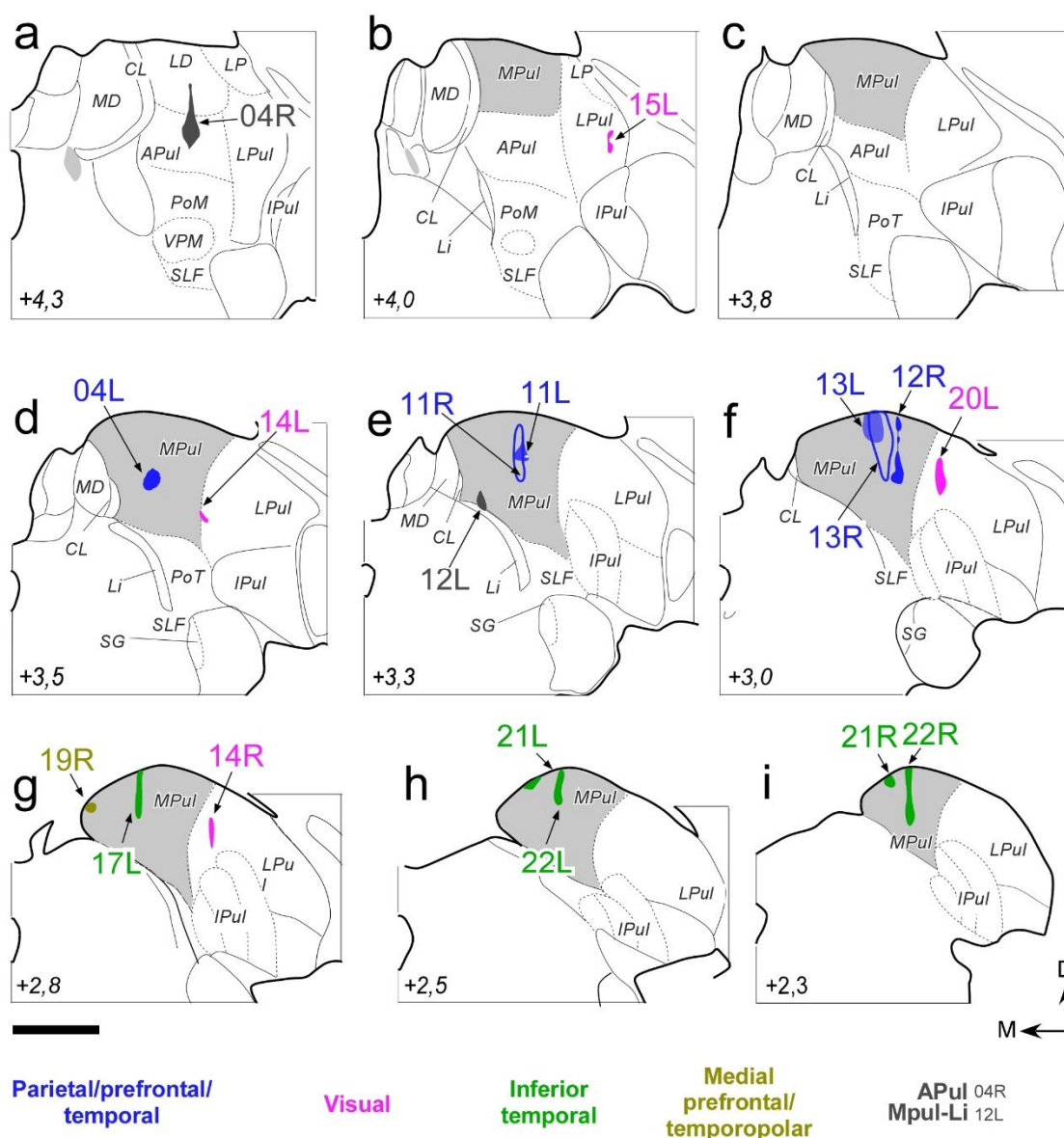
Finalmente, identificamos otros casos que no se ajustan a los patrones de innervación anteriores. El depósito más rostral, el caso 04dx, se encuentra localizado mayoritariamente en PulA e inerva de forma restringida el lóbulo parietal y la corteza cingular posterior. El depósito 19dx es el más medial de todos; inerva la región inferior del lóbulo temporal inferior y a las cortezas prefrontal medial y orbitofrontal. Para terminar, el caso 12L es el depósito más ventral de todos y está en contacto con el núcleo limitans.

## 2.2. Análisis cualitativo

De los depósitos representados en la **Figura 24** realizamos la reconstrucción de la distribución de los axones marcados en toda la neocorteza representando la localización y extensión tanto de los parches como de los axones aislados en las distintas áreas corticales; para ello, utilizamos mapas planos de toda la superficie cortical de cada hemisferio. Estos mapas resultan de gran utilidad ya que representan con baja resolución la distribución global del marcado axonal, facilitando la comparación entre casos.

Sin embargo, al ser una reconstrucción bidimensional una aproximación a la realidad, decidimos realizar reconstrucciones de los axones en niveles coronales representativos utilizando la cámara clara; en este caso no reconstruimos solamente las arborizaciones axonales terminales en corteza sino todo el recorrido de los axones al salir del tálamo, con las ramificaciones que dejaban en el núcleo reticular talámico (NRT) y siguiéndolos a través de la sustancia blanca. Por último, también dibujamos los contornos de referencia fundamentales del corte, como son los límites piales, inferiores de corteza y los generales del tálamo entre otros límites. Además, en la misma figura mostramos una ampliación de regiones de parches dentro

de corteza con su correspondiente laminación en capas. Del resto de casos de cada grupo mostramos únicamente los mapas planos.



*2.2.1. Grupo de depósitos con proyecciones en cortezas parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventral.*

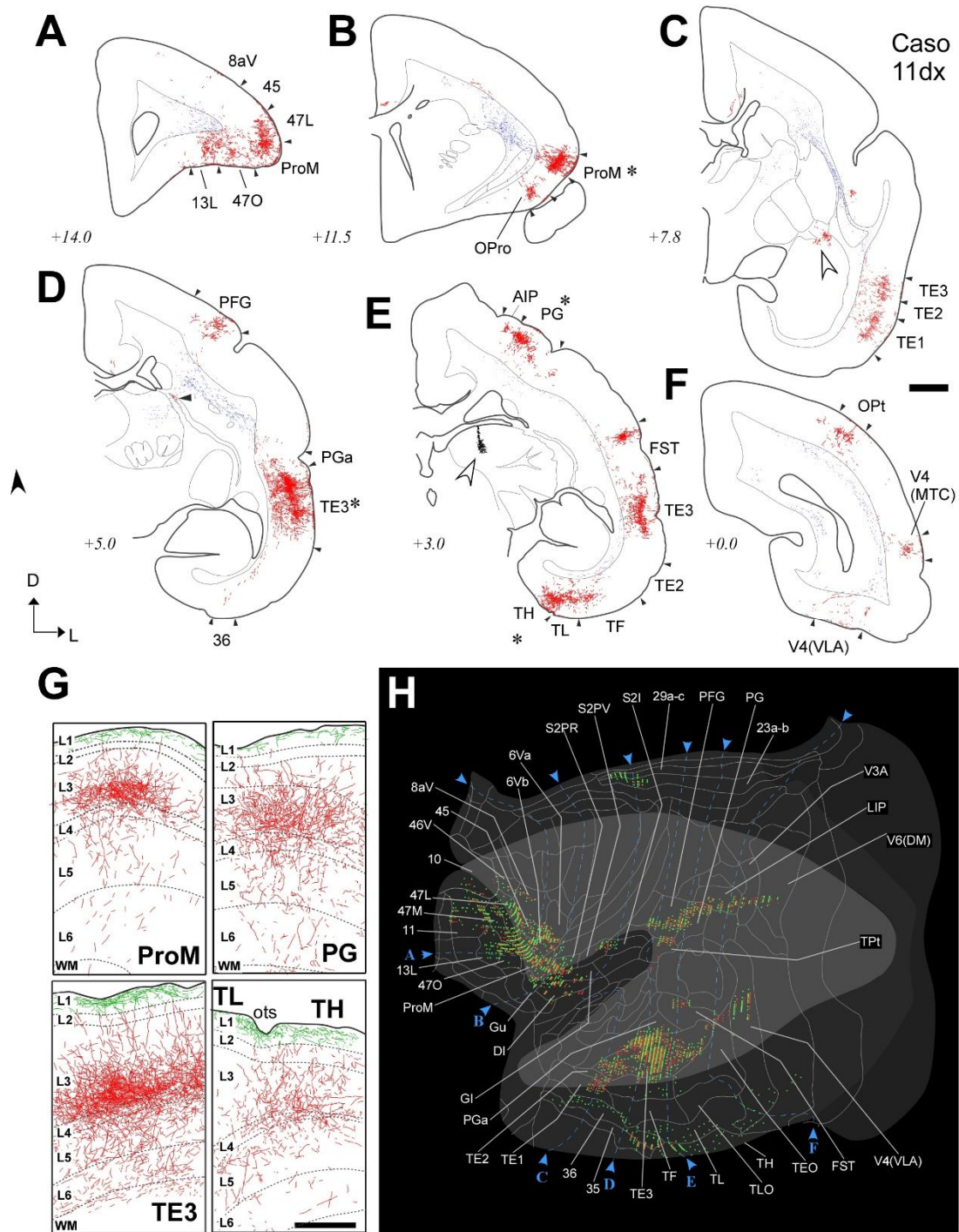
*(1) Análisis de un caso modelo con patrón multilobular en regiones corticales parietal, prefrontal y temporal.*

En las reconstrucciones coronales (**Figura 25 A-F**) observamos que los axones salen del tálamo y ramifican en el NRT en niveles anteriores (**Figura 25 D**) al sitio de inyección (**Figura 25 E**). En el nivel de salida los axones se integran en el brazo posterior de la capsula interna (ICp-3)<sup>3</sup>, atraviesan el estrato profundo de sustancia blanca hacia el estrato superficial donde el contingente diverge en un componente de fibras que sigue una dirección dorsal o superior hacia áreas de la corteza parietal (PFG) o cingular y otro componente que cursa en dirección ventral o inferior, hacia áreas de la corteza temporal inferior (PGa y TE3) y basal/medial (36). En un nivel más anterior (**Figura 25 C**) observamos la salida de otro contingente de axones que salen principalmente por el nivel más rostral del brazo posterior de la cápsula interna (Icp-1)<sup>4</sup>. Una parte de este se queda en el estrato profundo de la sustancia blanca donde cambia a una dirección transversal al corte coronal (axones que se observan como puntos) y la parte restante cursa paralelamente en sentido inferior por la cápsula extrema hacia las zonas rostrales de las áreas TE3, TE2 y TE1. El contingente transversal se dirige rostralmente, al principio en el estrato profundo para a continuación ir lateralizándose hacia la zona superficial (**Figura 25 B**) donde se observan axones que salen oblicuamente e inervan la región cortical opercular frontal; ProM. Para alcanzar el área cortical Opro, que se encuentra en posición ventral a la salida de los axones, estos atraviesan el claustró en sentido dorsoventral. Por último, en la **Figura 25 A** observamos que el contingente prefrontal cursa por la parte más superficial de la sustancia blanca dejando axones que entran en corteza para formar los parches de inervación en áreas 47L, ProM, 47O y 13L. En el corte en el que se encuentra el centro del depósito (**Figura 25 E**) observamos que los axones discurren por una región estrecha del estrato superficial de sustancia blanca inmediatamente adyacente al inicio de la corteza. En este nivel podemos observar los parches de axones marcados en corteza parietal posterior (AIP y PG) y en el lóbulo temporal, un parche

---

<sup>3</sup> Según Schmähmann y Pandya 2006 definido como el nivel que comienza cuando el NGL se encuentra en su punto medio y el putamen se encuentra formando islas hasta el final caudal del NGL.

<sup>4</sup> Definida por (Schmähmann y Pandya 2006) como la región de la cápsula interna que se encuentra en el nivel posterior a la rodilla de la cápsula interna (ICg), definida como la región localizada en el extremo más rostral del tálamo, y anterior al nivel ICp-2 que empieza cuando aparece el NGL (cf. Pg 506 de dicho libro)



**Figura 25. Caso modelo con depósito en PulM que presenta marcaje en lóbulos prefrontal, parietal y temporal.** Representación coronal, tangencial y radial de los axones TC marcados al realizar un depósito en la zona central del núcleo (cf. Figura 24 casos en azul) en el caso 11D.

**A-F:** Progresión rostrocaudal de seis niveles coronales representativos, en los que se ha dibujado en rojo la distribución de los parches de axones en corteza, así como de su recorrido por sustancia blanca.

**G:** Representación de la distribución tangencial los axones marcados sobre la reconstrucción bidimensional de corteza. Cada nivel coronal A-F está representado como una línea azul en la reconstrucción bidimensional.

**H:** Dibujos a cámara clara de la distribución laminar de los axones en corteza, cada parche representado está señalado con un asterisco en las reconstrucciones coronales y el área cortical en el que se encuentran está señalada en cada caso.

Abreviaturas: cf Lista de abreviaturas. Codificación de colores de los axones en G y H: En rojo están representados los axones en capas intermedias y en verde los axones localizados en capa1. Barras de calibración: A-F 2mm, G 500µm.

pequeño en la corteza FST, un parche más grande en el área TE3 y otro en corteza parahipocampal en las áreas TF, TL y TH. Por último, en el corte más posterior (**Figura 25 F**), observamos axones en la zona más próxima del estrato profundo donde discurren paralelamente al plano de corte. Estas fibras parecen dirigirse a innervar áreas occipitales dorsales (OPt) y ventrales (MTC). Nos llama la atención el contingente de fibras que pasan por el nivel más posterior del giro del cíngulo, cuando este une el lóbulo temporal con las áreas corticales cingulares en posición dorsal; de este contingente de fibras solo podemos suponer que se dirigen a innervar rostralmente áreas de la corteza cingular posterior (A29a-c). En este caso también se observó marcaje en el núcleo basolateral de la amígdala representado en la **Figura 25-C**.

La distribución laminar de los axones marcados anterógradamente, ilustrada a mayor detalle en 4 áreas corticales representativas: ProM, PFG, TE3 y en TH (**Figura 25 G**), nos indica que la innervación desde el PulM a corteza se concentra en dos regiones; en la parte superior de la capa 1 y en la parte inferior de capa 3 (Capa 3b) y en la capa 4. En las capas infragranulares 5 y 6 observamos lo que parecen ser axones de paso hacia capas superiores. En la mitad superior de la capa 3 y en la capa 2 también parece ser que sólo se encuentran axones de paso. Vemos diferencias en la innervación de la capa 4, en ProM no se aprecia gran densidad de los axones en capa 4 y en TH la capa 4 es casi indistinguible.

A continuación, procederemos a describir la distribución tangencial sobre el hemisferio del marcado axonal obtenido en el caso 11dx (**Figura 25 H**). En corteza prefrontal ventrolateral, observamos un parche de innervación densa en la convexidad lateral de la región frontal del hemisferio. En las diferentes subdivisiones del área 12/47 (Petrides y Pandya 2002) observamos que el parche de terminaciones axonales marcadas se extiende de forma anteroposterior en gran parte del área 47 lateral y medial, que se continúa en el opérculo frontoparietal abarcando gran parte del área precentral opercular (PrCO) definida por (Roberts y Akert 1963) o porción rostral de la corteza ventral premotora (ProM) definida por (Barbas y Pandya 1989). Por último, alcanza la región rostral y superior del surco lateral en corteza insular disgranular (DI) y granular (GI). Observamos otra zona con algunos axones marcados en regiones caudales del labio superior del surco lateral, en corteza somatosensorial secundaria rostral (S2PR) y ventral (S2PV).

Finalmente, observamos elementos axonales marcados de forma más dispersa respecto al parche mencionado anteriormente en otras regiones de la corteza orbitofrontal: 17 orbital, 13 lateral, 11 y en prosisocorteza orbital (OPro). En corteza insular observamos axones en menor cantidad en corteza gustativa primaria (Gu) e insular anterior (AI). En la superficie lateral del lóbulo prefrontal observamos en corteza dorsolateral, siempre en su región ventral, marcado



moderado en el área 45 y en las subdivisiones a y b del área premotora 6 ventral (6Va y 6Vb). Por último, observamos axones dispersos en áreas 10, 46 ventral (46v) y 8aV.

En la corteza parietal observamos una región inervada que se distribuye anteroposteriormente en la región parietal posterior inferior. Observamos que las proyecciones axonales marcadas se organizan en una franja continua que empieza desde el área PFG, continuándose por PG y en la región ventral de LIP. Este parche progresa perdiendo intensidad y convirtiéndose en una franja estrecha que atraviesa las cortezas occipitales V3A y V6DM. Fuera de esta zona de inervación observamos otro parche pequeño limitado a la corteza de transición temporo-parietal (TPt).

Las proyecciones que conformaron el parche con mayor densidad las encontramos en la superficie lateral del lóbulo temporal inferior. Este parche ocupa gran parte del área TE3 y en menor medida en las cortezas más ventrales del lóbulo temporal TE2 y TE1, y dorsalmente, el parche también se adentra en el área PGa. En la región medial del lóbulo temporal observamos axones aislados en corteza perirrinal que progresan rostrocaudalmente a un marcado más moderado, en la región anterior de la corteza parahipocámpica posterior, en las cortezas TF y TL, para luego dispersarse en el resto concretamente en las cortezas TLO y TH. Por último, observamos marcaje ligero en FST dorsal, y una franja también dorsal en TEO y en la corteza occipital V4(VLA).

#### (1) Descripción del resto de mapas planos con patrón similar

Obtuvimos 5 depósitos que compartían el patrón general de marcado del caso analizado en la **Figura 25**. Este patrón se caracteriza por presentar inervación en más de un lóbulo cerebral, es decir, presentan marcado por lo menos, en regiones de los lóbulos parietal, temporal y prefrontal. En la **Figura 26**, están representados los niveles estándar en los que se localizan los depósitos (**Figura 26 A**) y los mapas en los que se realizó la reconstrucción de la distribución de los axones marcados para cada depósito (**Figura 26 B-F**). Debido a que cada depósito es distinto se observan diferencias en las reconstrucciones de cada caso que describimos a continuación.

En el caso 13dx el depósito ocupaba gran parte de la extensión dorso-caudal en la región central del núcleo, también se observa algo de depósito por contaminación en la fimbria (**Figura 26 A**). El análisis de este caso mostró tres parches discretos de marcado intenso, en regiones similares a las del caso 11Dx, con mayor intensidad de marcado del parche prefrontal, seguido por el temporal y, por último, el de menor densidad relativa fue el que se encontraba localizado en la región parietal posterior inferior (**Figura 26 D**). Además, observamos otro parche de



inervación muy denso en la región temporal ventral que se distribuía anteroposteriormente en gran parte de las cortezas perirrinales (principalmente en área 35) y parahipocampales (especialmente en áreas TL y TLO). También se observó marcado disperso en MTC y liviano en la corteza prefrontal medial en áreas 14 granular y disgranular, y en la región orbital en áreas 11 y 13 medial y lateral.

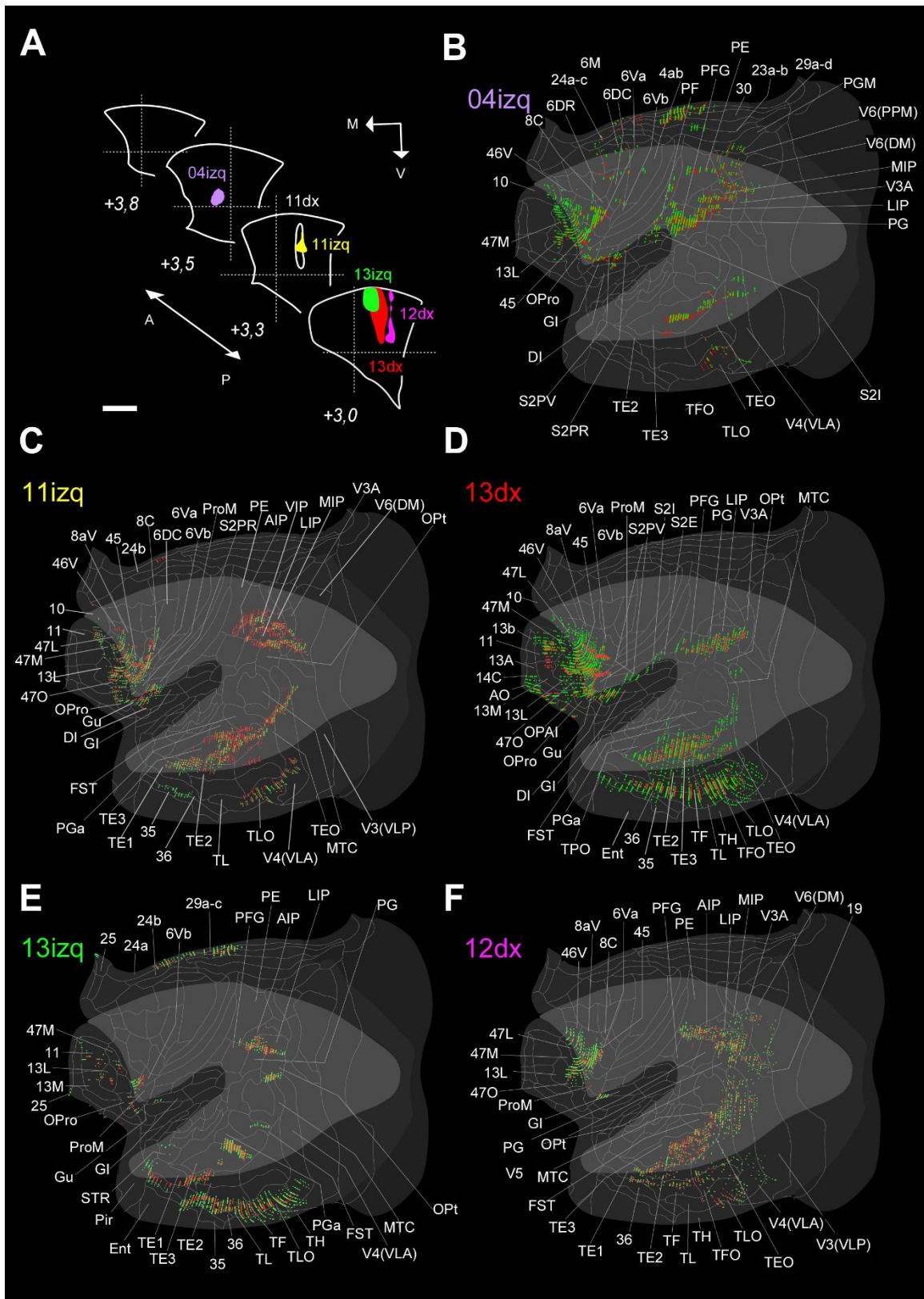
Los casos 12dx, 11izq (**Figura 26 C y F**) y 04izq (**Figura 26 A**) fueron depósitos similares de aspecto periforme. Debido a ello, en estas inyecciones había mayor cantidad de depósito en la zona inferior del núcleo y, por ende, las diferencias en el patrón que observamos se debieron a que las proyecciones dorsales del núcleo no se marcaron como en los casos 13dx y 11dx. De forma general, los tres casos presentaron una distribución tangencial menos profusa. En los casos 12dx y 04izq, el marcado axonal del depósito en el lóbulo prefrontal presentó un mayor componente en capa 1, que se dispersaba más tangencialmente, y un componente a capas intermedias más restringido en la mitad anteroposterior del parche. El marcado se extendía ampliamente en las áreas 47L, 47M y 45, y entraba parcialmente en la región ventral del área 8aV y rostral de la 6Va. Se observan también axones más dispersos en el área 47O y otro parche pequeño en el labio superior del surco lateral en el área insular granular.

En los casos 12dx y 11izq, observamos diferencias en el patrón de inervación de la corteza parietal posterior respecto a los demás casos. En el caso 12 dx observamos que el parche se ha desplazado dorsalmente de forma que estaba localizado en las áreas homólogas a las asociadas al surco intraparietal<sup>5</sup> (SIP) de otras especies de primates, que son las áreas AIP, LIP y MIP. El marcado continuaba abarcando gran parte del área 19 pero de forma más liviana que los demás casos con el mismo patrón.

El caso 11izq presentaba 3 parches separados de axones marcados que se encontraban en progresión dorsoventral dentro de las áreas del SIP. Además de las áreas reseñadas en el caso 12dx, este caso inervaba en el área MIP, no presentó marcado en el área 19 y entraba en la parte ventral del área V6 (DM). Por el contrario, el caso 04izq presentó un patrón de inervación parecido al descrito en el caso 11dx, aunque cambiaba el peso de la inervación que pasa a ser mayor en áreas del lóbulo parietal PF, PFG y PG. Se apreciaron dos parches más, uno centrado en las áreas LIP y MIP y otro conformando una banda estrecha en PE.

---

<sup>5</sup> En especies que presentan el surco intraparietal como macacos y cebus. En el caso del tití común este surco no está presente pero las homologías han sido establecidas por criterios arquitectónicos y hodológicos (Burman et al. 2008; Rosa et al. 2009)



**Figura 26. Mapas planos de casos con patrón en lóbulos parietal, temporal y prefrontal.**

**A:** Representaciones de todos depósitos de BDA, que originan un patrón multilobular, en los niveles representativos del atlas de tití común de Paxinos et al. 2012.

**B-F:** Se muestran las representaciones de la distribución tangencial de los axones marcados sobre el mapa.

Codificación en colores: cf. **Figura 25**, Barra de calibración A'-B' 1mm. Abreviaturas: cf. Lista de abreviaturas.

Una diferencia importante del caso 04izq es la presencia de marcado axonal en regiones anteriores de la corteza cingular posterior; las áreas 30 y 29.

En el lóbulo temporal inferior observamos que los parches de los tres casos presentan una amplia distribución anteroposterior. En el caso 04izq restringida a las áreas TE3 y V4(VLA). En los casos 12dx y 11izq el parche abarcaba, en progresión rostrocaudal, TE1, TE2, TE3, el extremo dorsal de TEO, terminando en V4(VLA). Observamos también elementos marcados en corteza temporal medial, restringido a TLO. En el caso 11izq se apreciaba un parche pequeño en corteza perirrinal y otro un poco más extenso en TLO que avanzaba dentro de V4(VLA). El marcado era más disperso en el caso 12R en áreas 36, TF, TFO, TLO y algo en V4 (VLA).

Finalmente, el caso 13izq (**Figura 26 E**) lo describimos aparte, ya que algunos aspectos de la localización de las proyecciones marcadas nos llamaron la atención. El depósito se quedó más dorsal respecto a todos los demás y afectó también a la zona de la fimbria inmediatamente superior al depósito. El marcado en corteza prefrontal ventrolateral era más escaso y disperso. En corteza orbitofrontal observamos axones aislados en las áreas 11, 13L, 13M y 47M y en corteza medial en el área A25. Se apreciaba un parche de tamaño pequeño en la zona rostral de la región del opérculo frontal; Opro, además de axones aislados en regiones del labio dorsal del surco lateral en las áreas gustativa primaria y granular insular. En el lóbulo parietal se localizaba un parche discreto, centrado en las áreas asociadas al SIP (AIP y LIP) con ligera afectación de las áreas PFG y PG. Dos parches se localizaban en las regiones organizadas visuotópicamente, MTC y FST. En el lóbulo temporal, se observaban tres parches; el más restringido, pero con densidad moderada en área TE3 y un poco de PGa, el siguiente atravesaba las áreas 36, TE1 y TE2 y por último el más ventral que tenía mayor densidad de marcado empezaba en la mitad de las áreas 35 y 36 y se continuaba atravesando la totalidad de las áreas TL y TLO, con menor afectación de las áreas TF, TH y V4(VLA).

### *2.2.2. Grupo de depósitos con un patrón restringido al lóbulo temporal*

En los casos 22dx, 22izq, 21dx, 21izq y 17izq observamos un patrón de inervación en múltiples áreas corticales que se encuentran restringidas dentro del lóbulo temporal y en ocasiones en la corteza occipital ventral rostral. Los depósitos talámicos están localizados en la región caudal del núcleo, en el tercio central de la dimensión mediolateral (**Figura 28 A**). Podemos observar que los depósitos de los casos 22dx, 22izq y 17izq tienen aspecto filiforme con orientación vertical por lo que abarcan una gran región dorsoventral dentro del núcleo, en cambio los depósitos de los casos 21izq y 21dx tienen un aspecto más circular localizándose en la región dorsal del núcleo.

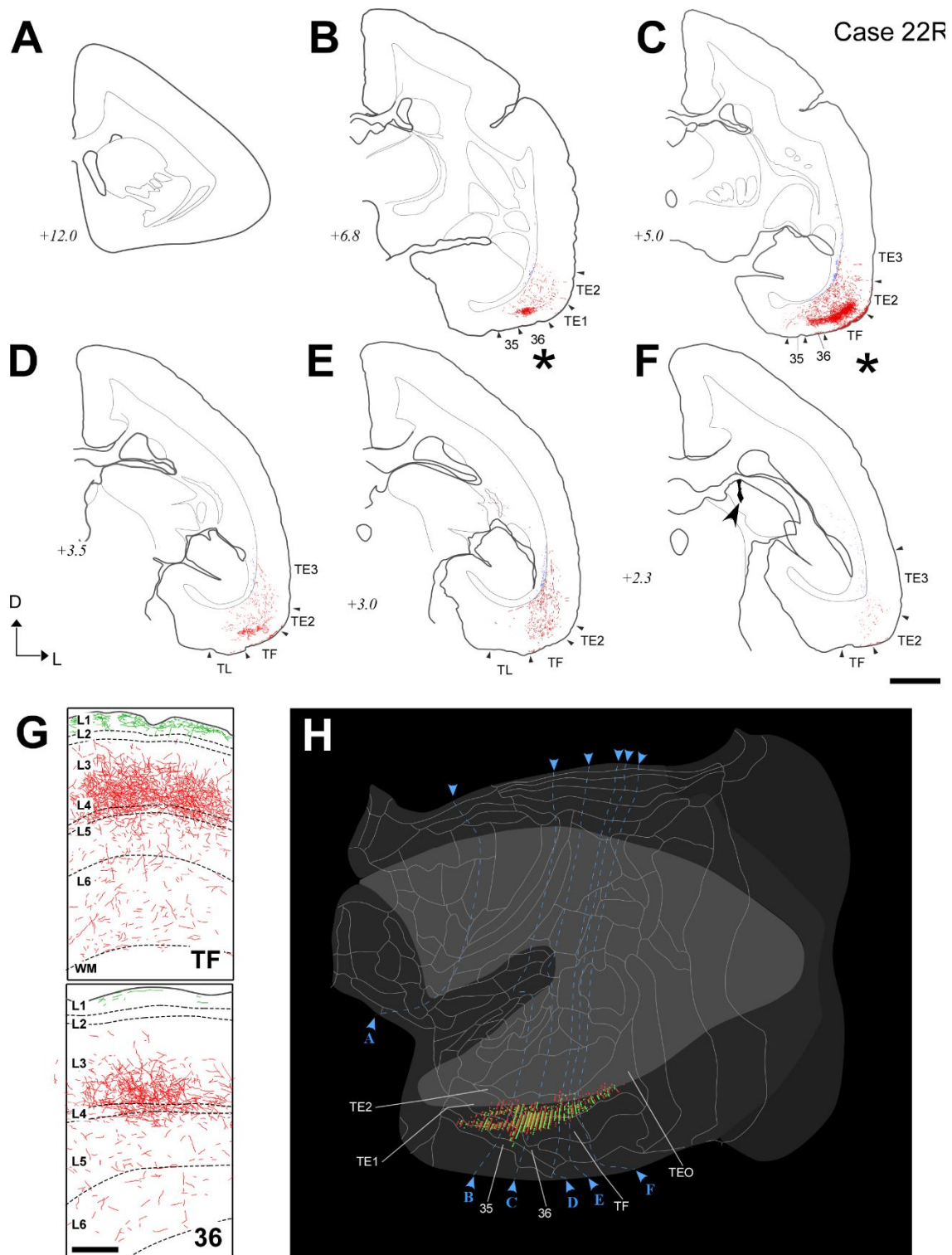
### [\(1\) Descripción del caso modelo patrón de marcado en lóbulo temporal](#)

Respecto a la distribución del marcado anterógrado, vamos a empezar describiendo el caso 22dx (**Figura 27**) que hemos escogido como caso modelo del patrón de innervación exclusiva en el lóbulo temporal.

Las reconstrucciones coronales nos indican que en el nivel en el que se localiza la inyección (nivel más caudal representado) se corresponde con el nivel donde se está terminando la extensión del parche de marcado. En sustancia blanca observamos la salida de algunos axones del estrato sagital (axones perpendiculares que se van colocando en paralelo) que se dirigen lateralmente, en sustancia blanca, hacia la parte del estrato superficial más cercana a corteza, en esta localización observamos que los axones toman una dirección inferior hasta llegar al nivel de las áreas TE2 y TF donde ramifican (**Figura 27-F**). En el siguiente nivel (en sentido anterior) representado observamos la salida de los axones de tálamo donde dejan una ligera ramificación en NRT y a continuación parece ser que se incorporan al estrato sagital (**Figura 27-E**). Se observa otro contingente de axones en una posición inferior que recorren una pequeña distancia dorsoventral por el estrato superficial e inervan ligeramente las áreas TE2 y TF. En los niveles más anteriores (**Figura 27 B-D**) observamos que los axones en sustancia blanca se encuentran en niveles inferiores siendo ya probablemente parte de un contingente que sale por el estrato sagital en su parte ventral (cf. Pg544 de Schmähmann y Pandya 2006). Inmediatamente a esta salida, los axones se dirigen a las cortezas TE2, TF y 36 y arborizan profusamente (**Figura 27 B-D**) en el nivel más rostral observamos que el parche ha reducido su densidad y se ha hecho más pequeño arborizando profusamente en A36 y de forma más ligera en TE1 y 35. En niveles rostrales (lóbulo frontal) no se aprecian axones marcados (**Figura 27 A**).

En la reconstrucción radial de los axones en corteza (**Figura 27 F**) observamos en dos áreas representativas TF y 36, que el grueso de la innervación se dirige principalmente a las capas 3b y 4 y a capa 1, siendo la innervación de la capa 1 en el área 36 más escasa.

Finalmente, respecto a la distribución tangencial de los axones marcados anterógradamente (**Figura 27 F**) observamos la presencia de un único parche en la región ventral del lóbulo temporal, que se mantiene siempre muy cercano a la convexidad cortical ventral. Este parche se extiende anteroposteriormente innervando de forma ligera en cortezas perirrinales (35 y 36) y de forma más profusa en las áreas TF y región ventral de TEO. El marcado en capa 1 es coexistente con el marcado en capas intermedias, excepto en el área 36 donde se observa preponderancia del marcado en capas intermedias.



**Figura 27. Representación de un experimento de trazado anterógrado en un caso tipo que exhibe un patrón de innervación restringido al lóbulo temporal.**

**A-F:** Reconstrucciones coronales realizadas en cámara clara en niveles representativos.

**G:** Dibujos realizados con cámara clara de los parches en corteza con la laminación en capas, en dos áreas corticales representativas: TF y 36.

**H:** Representación de la distribución tangencial del marcado sobre una representación 2D de la superficie cortical. Las líneas en color azul discontinuas se corresponden con los contornos de los niveles coronales representados en A-F.

Codificación en colores de F cf. **Figura 25**. Barras de calibración: A-F 2mm y G 500µm.

## [\(2\) Descripción de la distribución tangencial en el resto de casos con patrón de marcado en el lóbulo temporal.](#)

Obtuvimos 4 depósitos con un patrón parecido al caso analizado anteriormente. Los mapas planos recogidos en la **Figura 28** B-E ilustran la distribución tangencial de los axones marcados. En los casos 21izq y 22izq la mayor parte de los axones marcados se encuentran en las cortezas que conforman el giro parahipocampal (Alocoteza entorrinal y las proisocortezas, perirrinal y parahipocampal posterior), en el primer caso las proyecciones se esparcen más, afectando a mayor número de áreas; en el segundo caso la inervación está más restringida a las cortezas perirrinales y TE2. En los casos 17izq y 21dx podemos apreciar axones marcados en la superficie lateral del lóbulo temporal formando bandas paralelas extendidas anteroposteriormente en distintas alturas del área TE3, el caso 17izq presenta otro parche dorsal en áreas PGa y STP, además de observarse una preponderancia de la inervación en capas intermedias.

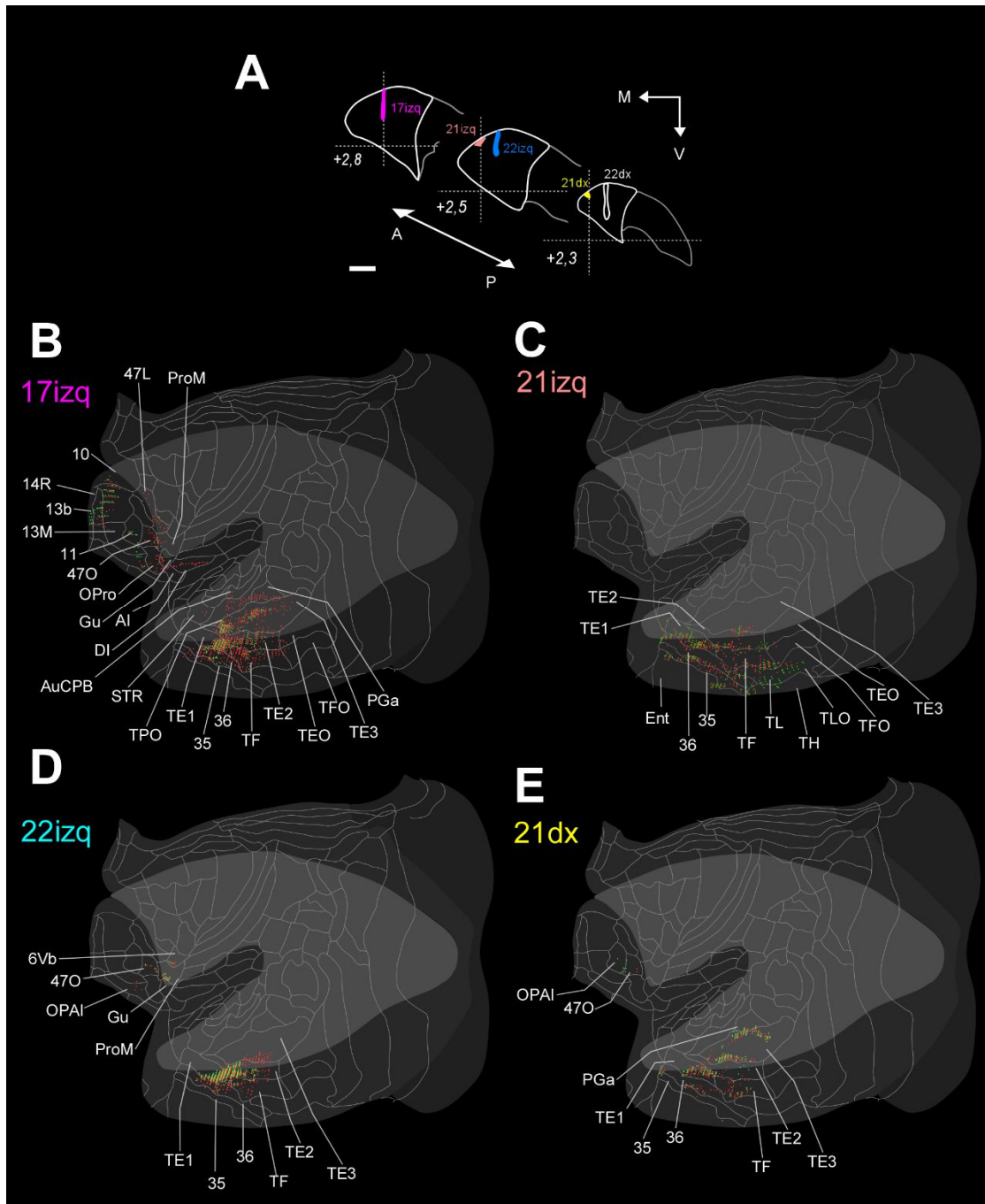
Por último, un aspecto que nos ha llamado la atención es la aparición de marcaje ligero en corteza prefrontal ventrolateral cerca de la región opercular en los casos 22izq, 21dx y 17izq que es más evidente en el último (el más rostral de los 5 casos). En el caso 17izq también apreciamos axones aislados en las cortezas orbitofrontales 13b, 13m, 13L y 11.

### *2.2.3. Grupo de depósitos que presentan proyecciones restringidas al lóbulo occipital*

Encuadramos dentro de este grupo los depósitos que tienen la mayoría de sus axones marcados en la corteza occipitales. Dependiendo del caso también se observan arborizaciones axonales marcadas en la corteza temporal inferior caudal, especialmente en área TEO. Son áreas que conservan todavía cierta organización visuotópica (Boussaoud et al. 1991). Por ello hemos agrupado estos casos como visuales no polimodales, asociados a características visuales menos complejas respecto a las características de escenas complejas visuales asociadas a las regiones más rostrales del lóbulo temporal inferior/ventral (Orban et al. 2014).

Los casos 14dx y el caso 20izq se localizan en la región más medial de PulL en una región de transición entre PulM y PulL. Los otros casos agrupados en esta categoría se localizan en posiciones más laterales de PulL, caso 14izq y caso 15dx (**Figura 30 A**).





**Figura 28. Distribución tangencial de casos con axones marcados restringido en lóbulo temporal**

**A:** Representaciones de todos depósitos de BDA, que originan un patrón exclusivo en la región ventral del lóbulo temporal, en los niveles representativos del atlas de tití común de Paxinos et al. 2012.

**B-E:** Se muestran las representaciones de la distribución tangencial de los axones marcados sobre la reconstrucción bidimensional de la superficie cortical.

Codificación en colores: cf. **Figura 25**, Barra de calibración A'-B'1mm. Abreviaturas: cf. Lista de abreviaturas.

Respecto a la forma del depósito todos presentan apariencia filiforme y tienen orientación vertical, observándose un cierto engrosamiento en la región ventral del depósito del caso 20izq.

[\(1\) Descripción del caso 14dx, modelo de innervación occipital.](#)

La zona de depósito se localiza en un nivel rostral respecto al grueso de marcado en corteza (**Figura 29 C**), se observan axones saliendo del depósito y progresando lateralmente hacia el ventrículo lateral. No conseguimos localizar en nuestras secciones coronales la zona de ramificación en NRT, una posibilidad es que sea una región muy estrecha que ha quedado a medio camino entre los 6 cortes de distancia que tenemos en la serie.

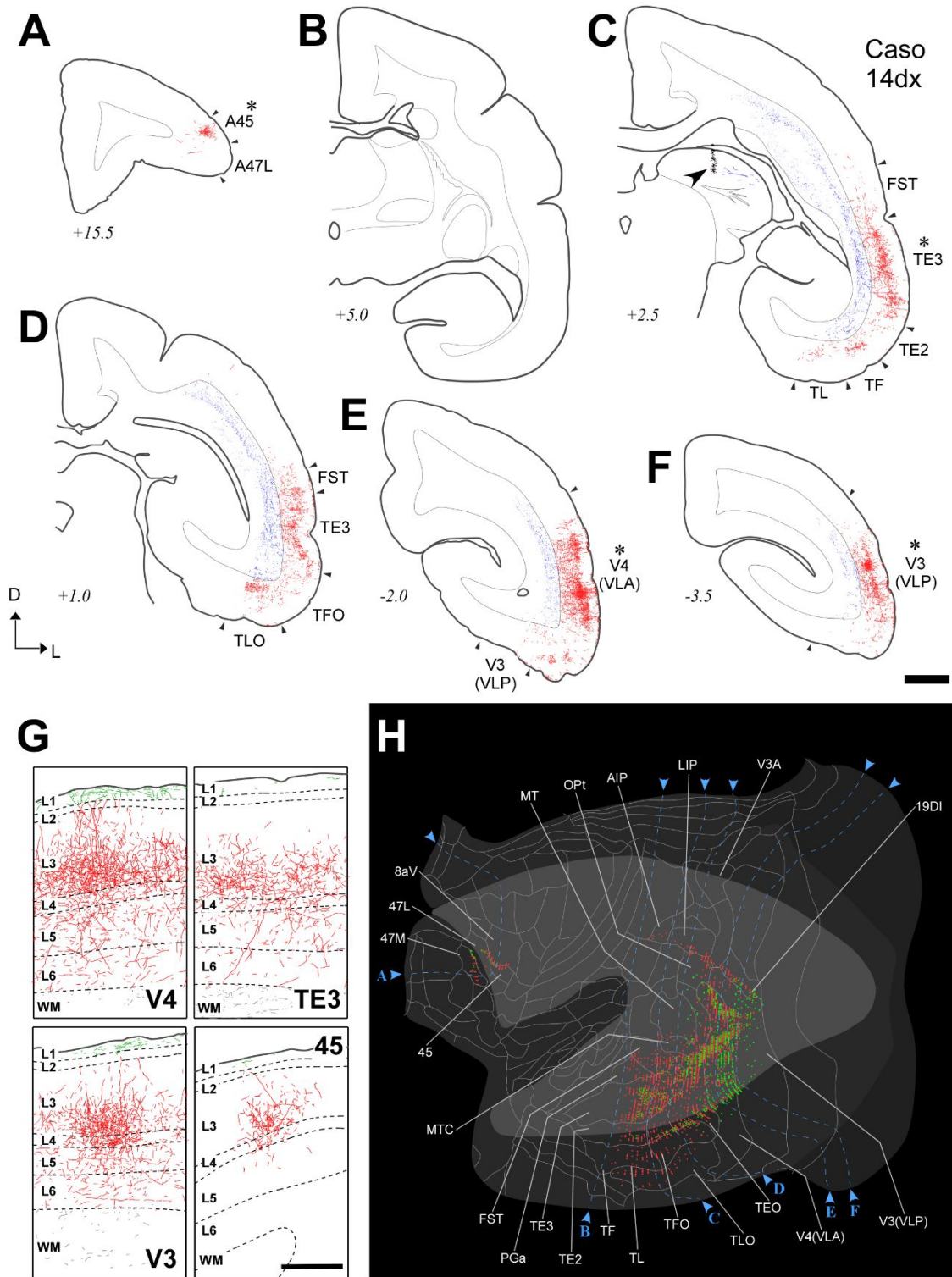
En el nivel de la inyección observamos gran cantidad de axones en la parte medial del estrato sagital justo adyacente a la estría terminal, estos axones parecen ser que siguen dos caminos. Por una parte, pueden estar integrándose en el fascículo sagital para innervar regiones occipitales más caudales, o saliendo por el brazo posterior de la capsula interna que se encuentra inmediatamente dorsal al estrato sagital, para cursar ampliamente por el estrato superficial de la sustancia blanca hacia localizaciones ventrales donde los axones salen y ramifican profusamente en áreas de la corteza temporal inferior (áreas FST, TE3, TE2, TF y TL). En el siguiente nivel caudal representado (**Figura 29 D**), observamos algunos axones que han salido de tálamo y se están integrando en el estrato sagital. Además, se observan axones que provienen de niveles anteriores (orientación transversal) y otros que parecen estar saliendo del estrato sagital en su parte ventral. Los axones recorren por el estrato superficial hasta la localización en la que entran en la corteza para innervar en las áreas FST y TE3 de la corteza temporal inferior, y las áreas TFO y TLO de la corteza temporal basal. En las **Figura 29 D-E** observamos que los axones también salen por el estrato sagital y recorren el estrato superficial hasta dejar sus terminaciones en la corteza, concretamente en las áreas V4 y V3. Por último, este caso presenta ramificaciones axonales en corteza prefrontal ventrolateral (**Figura 29 A**), del material revelado no conseguimos deducir cual es el recorrido que siguen los axones para llegar a esta localización, posiblemente se deba a que en gran parte de su trayecto los axones tienen una orientación perpendicular al plano de corte (con aspecto de puntos) lo que hace muy complicada su visualización cuando no están formando un contingente numeroso, como sucede en este caso.

Podemos observar en las reconstrucciones de la distribución radial en corteza (**Figura 29 G**) que hay mayor preponderancia del componente a capas intermedias, capas 3b y 4, respecto al componente en capa 1.

El análisis de la distribución de los axones en la reconstrucción plana de corteza (**Figura 29-H**) nos muestra la existencia de un parche de marcado que empieza en la región posterior de TE3, atraviesa las áreas TEO, V4 y termina en V3. Este parche se mantiene en la misma distancia respecto al lugar de plegamiento de la corteza temporal. Otro parche se localiza en posición más



ventral junto al borde inferolateral de la corteza, tiene una gran amplitud anteroposterior, atravesando las áreas TE2, TFO, TEO y terminando en V4.



**Figura 29. Representaciones del marcado axonal en corteza obtenido en el caso 14dx.**

**A-F:** Reconstrucción coronal a cámara clara de niveles representativos organizados anteroposteriormente.

**G:** Reconstrucciones de la distribución radial dentro de corteza en áreas corticales seleccionadas.

**H:** Distribución tangencial de los axones marcados en corteza. En líneas azules se representan los contornos correspondientes a los cortes coronales representados en A-F.

cf. **Figura 25** para codificación de colores.

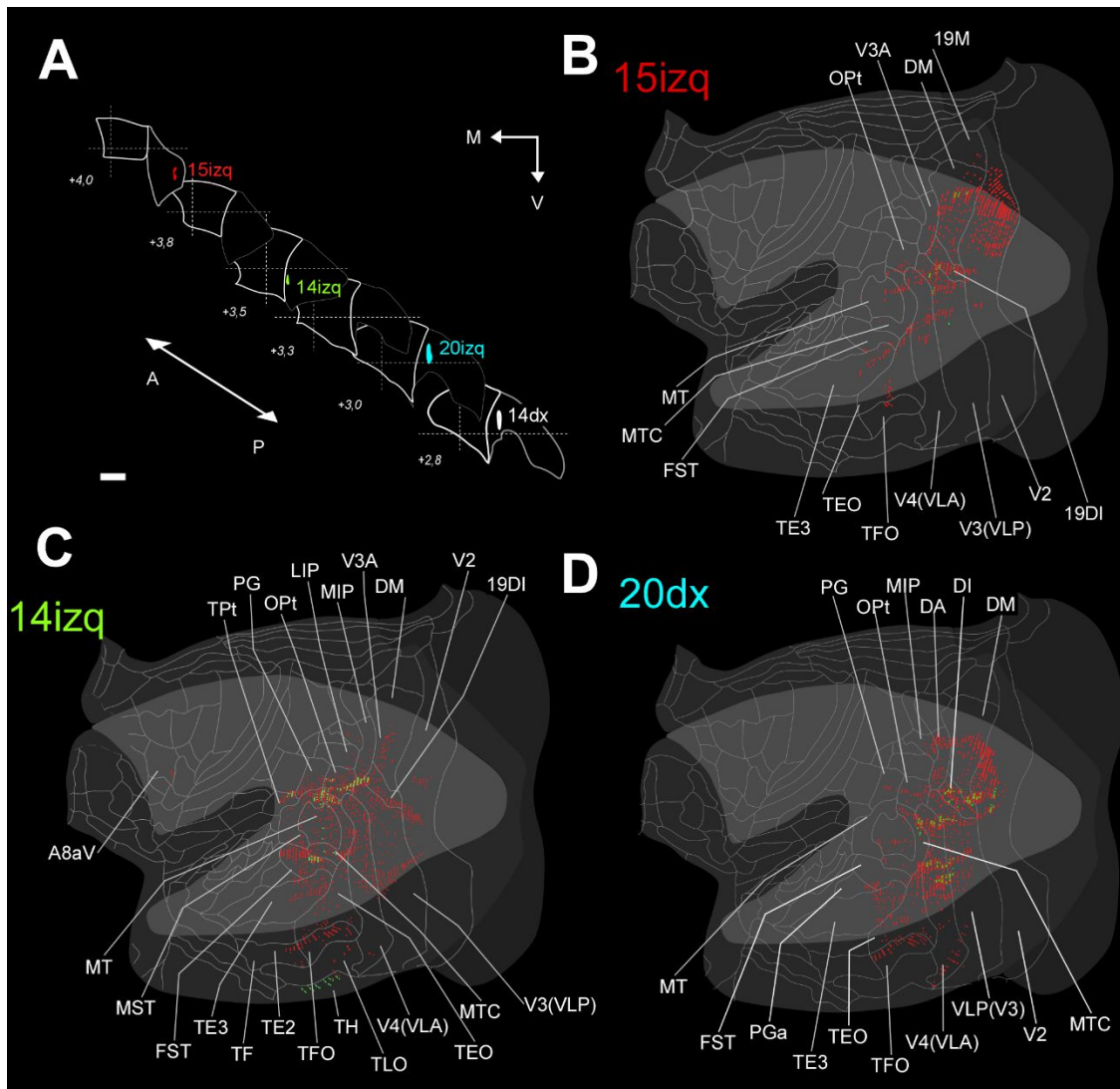
Se observan otros dos parches dorsales, el primero es muy fino y de poca densidad, asociado a la parte más dorsal de V4 y V3, y el segundo parche tiene una densidad mayor y esta localizado ventralmente respecto al anterior, en las mismas cortezas. El componente a capas intermedias presenta mayor distribución que el que se dirige a capa 1.

#### (2) Distribución tangencial en los casos con innervación dirigida principalmente al lóbulo occipital

Como mencionamos anteriormente, estos casos están dentro del PulL. Observamos que aparte de innervación en áreas similares al caso 14dx se añade innervación en áreas corticales que pertenecen a la corriente visual dorsal. Concretamente en las áreas DA, DM y en la región dorsal de V2 se observa un parche de innervación exclusiva en capas intermedias.

También apreciamos la existencia de otro parche ventral al anterior que empieza en áreas caudales del lóbulo parietal posterior inferior, PG y OPt, continuándose en las áreas del lóbulo occipital DA, DI y DM. Dos parches se encuentran asociados a las áreas satélites de MT, uno localizado dorsalmente en MTC y V3, y el otro ventral a MT en las áreas MST y en MTC. Finalmente, observamos cuatro parches estrechos que empiezan en la región caudal del lóbulo temporal (zona caudal de TE3 y en TEO) y terminan en áreas rostrales de la corteza occipital ventral (V4 y V3).

Hemos analizado los casos 14izq y 15izq, que se corresponden con depósitos localizados en PulL (**Figura 30-C y D**). Nos llama la atención la disminución drástica de la densidad de axones marcados en capa 1 que es bastante pronunciado en el caso 15izq, además en este caso vemos que las proyecciones se concentran en áreas asociadas a la corriente visual dorsal, donde se localizan representaciones del campo visual periférico. El parche más profuso se encuentra en la región dorsal de las áreas DM y V2, en localización más inferior vemos otro parche de menos intensidad que se encuentra en las regiones dorsales de las áreas MTC, V4 y en gran parte del área 19DI. Finalmente, otro parche muy ligero atraviesa regiones dorsales en TE3caudal, V4 y V3 en su región intermedia. El caso 14izq presenta marcado más difuso, se aprecia un foco de marcado que empieza en el área de transición TPt, continua por región ventral de PGy OPt, con afectación de MTC dorsal y terminación en 19DI. Otro parche se localiza ventral a MT en FST y MTC ventral. Se observan también axones dispersos, localizados en capas intermedias, en TE3, TEO y en cortezas parahipocampales TF y TFO. Vemos también axones dispersos dirigidos a capa 1 en el área TH.



**Figura 30. Distribución tangencial del marcado cortical en los casos con patrón principalmente occipital.**

**A:** Representaciones de todos depósitos de BDA, que originan un patrón multilobular, en los niveles representativos del atlas de titi común de Paxinos et al. 2012.

**B-F:** Se muestran las representaciones de la distribución tangencial de los axones marcados sobre el mapa. Codificación en colores: cf. **Figura 25**, Barra de calibración A'-B'1mm. Abreviaturas: cf. Lista de abreviaturas.

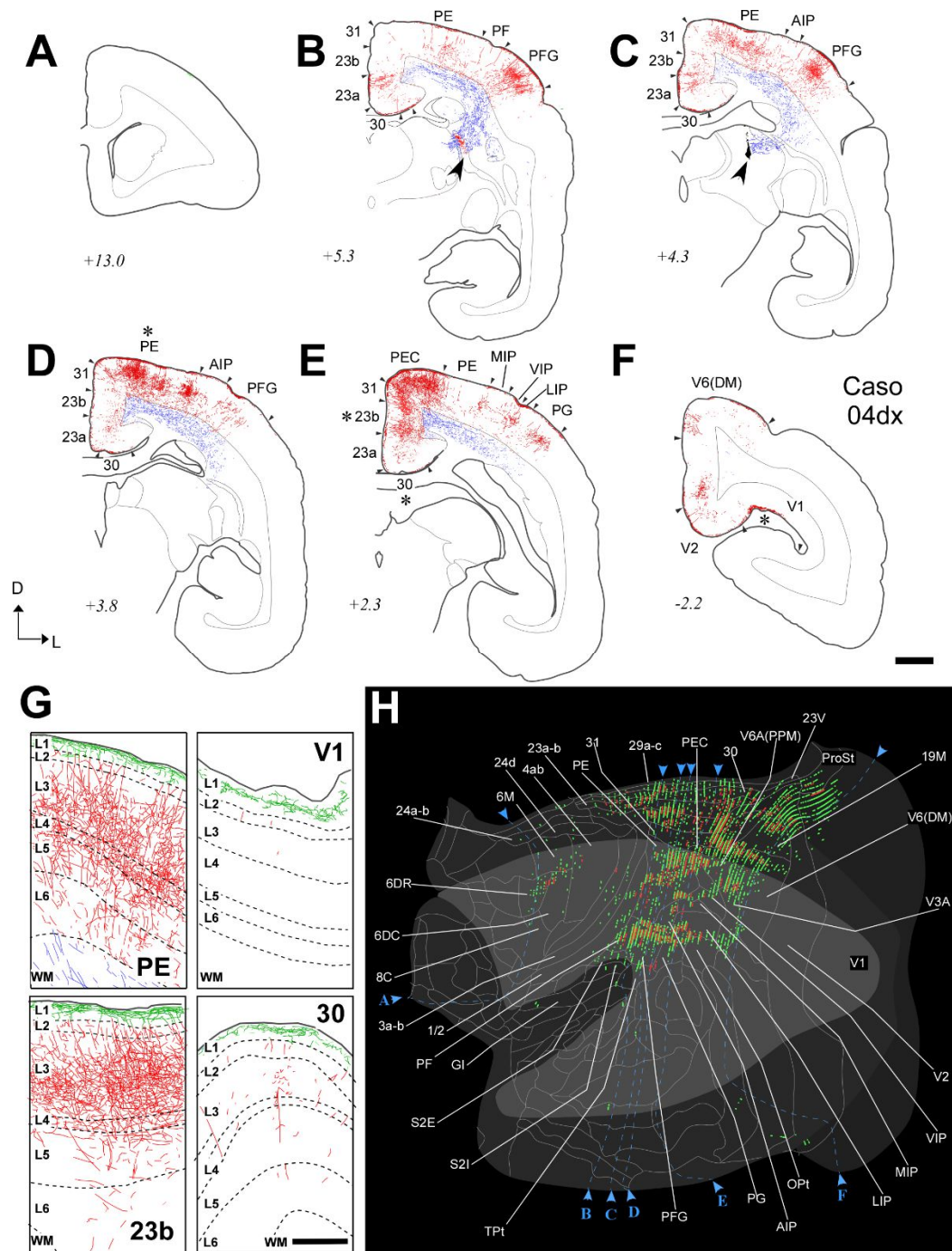
#### 2.2.4. Depósitos que presentan un patrón cortical individual

(1) Caso con un patrón restringido mayoritariamente al lóbulo parietal: depósito en pulvinar anterior.

Observamos que, a pesar de obtener marcado en múltiples áreas corticales, este se encuentra restringido al lóbulo parietal y cingular posterior. En niveles rostrales del lóbulo frontal no se observó ningún elemento axonal marcado (**Figura 31-A**).

En las reconstrucciones coronales podemos apreciar que el marcado en corteza es profuso con aparente equivalencia de intensidad del componente axónico a capas intermedias y a capa

superficial. Los axones parecen salir del tálamo, dejando colaterales en el NRT, en el nivel del centro del depósito (**Figura 31-C**) y adyacente, formando un contingente numeroso de axones que discurren paralelamente al plano de corte por el brazo posterior de la capsula interna.



**Figura 31. Análisis distribución tangencial del marcado axonal en el caso con depósito en Pula.**

**A-F:** Reconstrucciones a cámara lucida de los axones marcados en niveles coronales, en progresión rostrocaudal, representativos.

**G:** Distribución tangencial del marcado sobre una reconstrucción bidimensional de corteza, los perfiles que corresponden a los niveles reconstruidos en A-F se indican con una línea azul.

**H:** Reconstrucciones a cámara lucida de la distribución de los axones en cortezas representativas.



Barras de calibración 2mm y 500µm. Codificación mapa superficie cortical cf. **Figura 25**

En el segundo nivel representado podemos apreciar axones entrando y ramificando en la región dorsal del putamen y en cabeza del caudado (**Figura 31-B**), el contingente de axones marcados atraviesa el estrato profundo de sustancia blanca y progresa dorsalmente por el estrato superficial. En el nivel que les corresponde, se puede apreciar la salida de los axones de sustancia blanca y entrada en corteza para inervar áreas de la corteza parietal posterior lateral y mesial (precuneus), incluyendo grandes regiones del giro del cíngulo posterior (**Figura 31 B-E**). El marcado progresa principalmente por la región mesial del lóbulo occipital, en áreas V6(DM) y V2. También se observan axones marcados en capa 1 en el labio superior del surco calcarino; en área V1 (**Figura 31 F**).

la reconstrucción radial de los axones marcados en corteza (**Figura 31 G**), nos muestra un patrón con un foco intenso de marcaje en las capas 3b y 4 y otro foco importante en capa 1 en las áreas PE (parietal posterior superior) y 23b (cingular posterior). Sin embargo, este patrón no se repite en todas las áreas, como hemos querido representar en el área 30 (cingular posterior), donde observamos escaso componente a capas intermedias y más profuso en capa 1, hasta terminar en V1 dónde solo se presenta el componente de capa 1 en la corteza visual primaria (V1).

La distribución tangencial de los axones marcados se localiza mayoritariamente en el lóbulo parietal, de forma ligera en su región anterior (áreas 1/2, 3 a-b y S2), y de forma profusa en gran parte de las áreas que constituyen su región posterior la **Figura 31 H**. Se pueden apreciar axones dispersos en áreas de la corteza dorsolateral prefrontal (áreas premotora (4ab) y suplementarias (6M, 6DC y 6DR)) y en cingular anterior (áreas 24 a-d). En la corteza parietal posterior, el parche de marcado más ventral recorre en sentido rostrocaudal las áreas PF, PFG, PG, OPt y terminando en V6(DM). Inmediatamente dorsal observamos otro parche estrecho que inerva en áreas asociadas al SIP: LIP, MIP y VIP. Otro parche asociado al borde medial del lóbulo parietal empieza en PE, área con mucha intensidad de marcado, progresa hacia el área anterior(PEC) y posterior (PGM) del precuneus y se extiende en el lóbulo occipital en la región medial del área V6(DM). Finalmente observamos marcado continuo en gran parte de la extensión del giro cingular posterior (áreas 29 a-c, 23 a-b, 31 y 30) que progresa en regiones caudales ya dentro de lóbulo occipital dorso-medial donde observamos disminución progresiva del componente a capas profundas en áreas 19M, 23v y ProSt.

[\(2\) Distribución radial y tangencial del marcado axonal de un caso con patrón en cortezas de la región prefrontal medial y temporal polar.](#)

Hemos realizado reconstrucciones de la distribución radial y tangencial de los axones marcados tras realizar un depósito en una región medial y caudal del PulM **Figura 32**. Sólo disponemos de este depósito, que produce un marcado axonal leve debido a que la inyección es la de menor tamaño analizada.

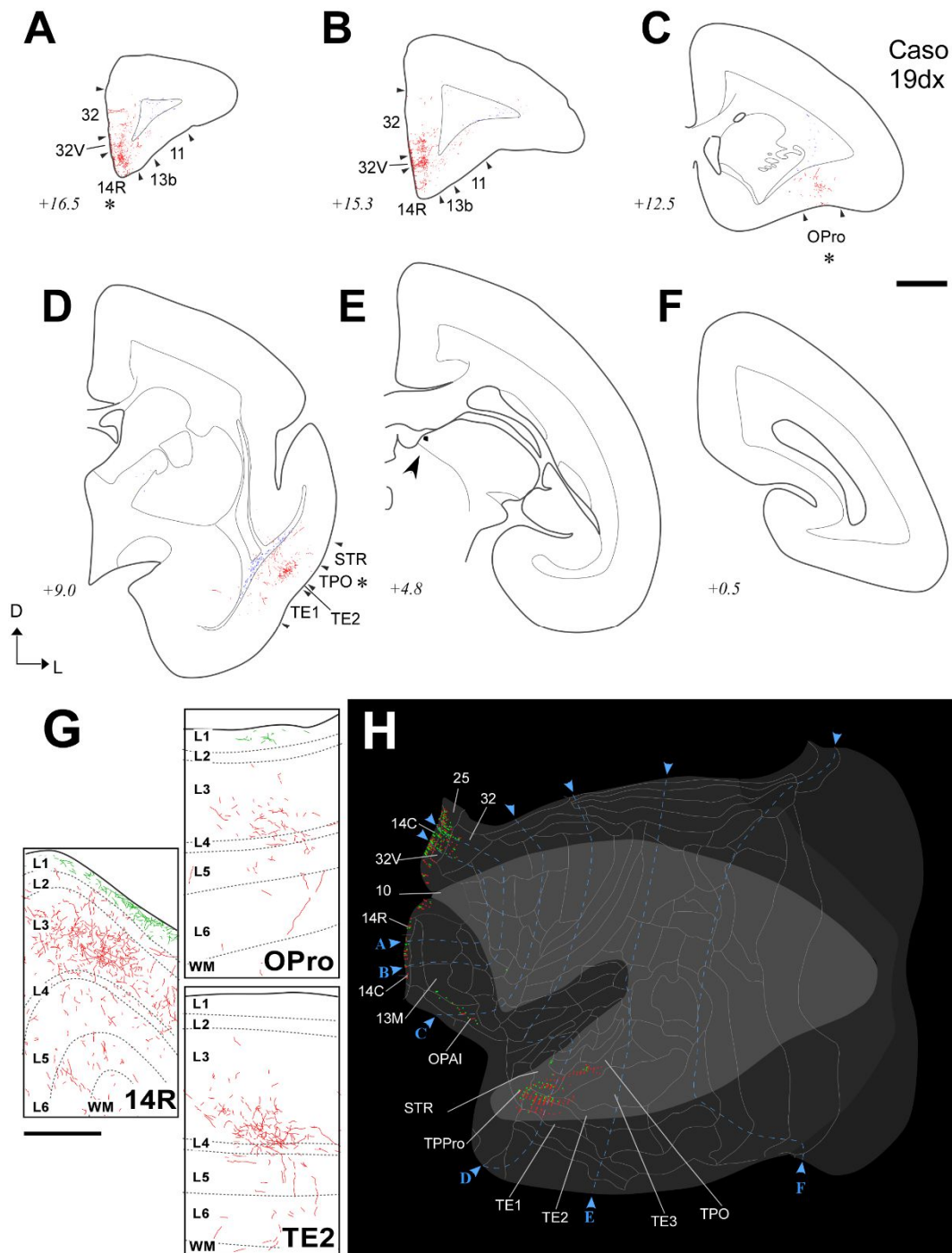
En las reconstrucciones coronales apreciamos que gran parte de la región posterior del hemisferio se encuentra libre de terminales marcadas (**Figura 32 E y F**). Los terminales axónicos se localizan en la región anterior del lóbulo temporal, en una posición rostral respecto al depósito de BDA (**Figura 32 E y D**). En la región caudal orbitofrontal (OPro), también se localizan elementos axónicos marcados en baja densidad (**Figura 32 C**). Finalmente, en niveles anteriores los axones forman plexos que se extienden dorsoventralmente en la región ventral de la corteza prefrontal medial, en las áreas 14R y 32 (**Figura 32 A y B**).

Respecto a la distribución radial, en corteza 14R la inervación axonal se distribuye en capa 1 y capas intermedias. En el resto de áreas el componente a capa 1 llega a ser mínimo o ausente como podemos apreciar en las reconstrucciones de las áreas OPro (orbital caudal) y TE2 (**Figura 32 G**).

La distribución tangencial de los axones marcados (**Figura 32 H**) presenta predominio por áreas rostrales de la región medial de la corteza prefrontal (áreas 32V, 10, 14R y C) con mayor importancia de la inervación de la a capa 1. Observamos que a lo largo de las áreas corticales disgranulares en las áreas OPro y OPAI hay elementos axónicos marcados en baja densidad. Finalmente podemos apreciar parches de axones marcados en la región rostral del lóbulo temporal, se observan tres franjas en sentido anteroposterior, la primera franja se localiza ventral a las demás, tiene poca extensión anteroposterior y se localiza en la región rostral del área TE1. La segunda franja es la que tiene mayor densidad de axones marcados y se encuentra en el tercio anterior del área TE2. Por último, la tercera franja en posición dorsal tiene menor densidad que la anterior pero una amplia extensión anteroposterior en gran parte del área polisensorial TPO.

[\(3\) Distribución tangencial del marcado axonal de un depósito con localización ventral en el núcleo pulvinar medial.](#)

El último caso que describiremos es el caso 12izq, su depósito se encuentra localizado en la región ventral del PulM entrando parcialmente en el límite (**Figura 33 A**), es una región de la



**Figura 32. Análisis distribución marcado axonal en el caso con depósito en Li-PulM.**

**A-F:** Reconstrucciones a cámara lúcida de los axones marcados en niveles coronales, en progresión rostrocaudal, representativos.

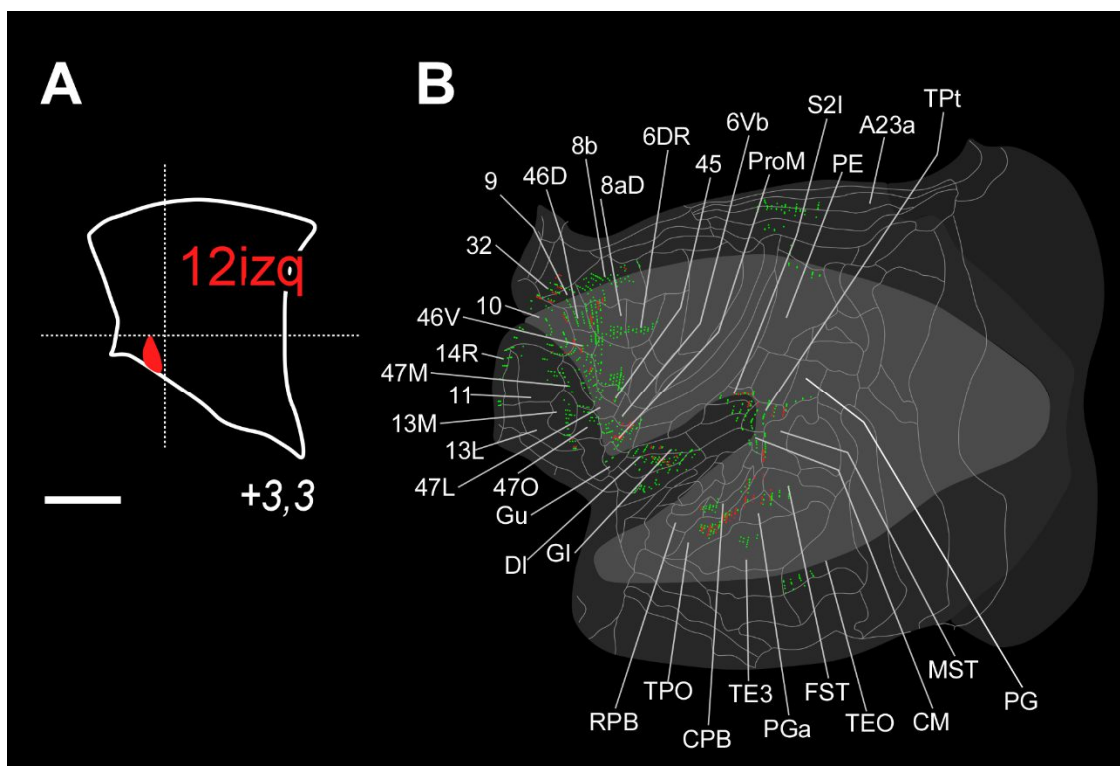
**G:** Reconstrucciones a cámara lúcida de la distribución de los axones en cortezas representativas.

**H:** Distribución tangencial del marcado sobre una reconstrucción bidimensional de corteza, los perfiles que corresponden a los niveles reconstruidos en A-F se indican con una línea azul.

Barras de calibración 2mm y 500µm. Codificación reconstrucción bidimensional cf. **Figura 25**

que no tenemos más casos. El patrón de distribución tangencial del marcado en corteza nos muestra axones marcados en áreas asociativas auditivas “parabelt”, afectando a las áreas colindantes TE3, CM y MST. Observamos marcaje ligero y principalmente de capa 1 en el labio

superior del surco lateral, en su región anterior: corteza insular granular y disgranular y en su región posterior en área somatosensorial secundaria (S2I), el marcado termina en el final del surco, en área de transición TPt. Este caso también exhibe un difuso marcado asociado a la región opercular del lóbulo frontal que afecta a las áreas 47L y M, 47 O, 45 y Gu. Otra zona de marcado tenue se encuentra asociada al área 46V y D y en área 8aD.



**Figura 33. Localización del depósito en tálamo y distribución tangencial de los axones marcados en corteza del caso 12izq.**

**A:** Representación del depósito de BDA del caso 12izq en el nivel representativo del atlas de tití común de Paxinos et al. 2012.

**B:** Distribución tangencial de los plexos axónicos marcados en una representación 2D de la superficie cortical sobre mapas planos de corteza en el caso 12izq.

Barra de calibración: 1mm.

Para terminar este bloque de análisis elaboramos una tabla resumen que nos permite comparar de forma cualitativa los patrones de marcado entre los diferentes casos analizados. En la tabla cada columna representa el marcado en las distintas áreas corticales con su densidad relativa (**Tabla 8**).

De forma global observamos que excepto en el caso de PulvA (04dx) todos los casos con depósitos en PulM presentan marcado preponderante en regiones inferiores del lóbulo temporal. Las cortezas perirrinales y parahipocampales de la región medial del lóbulo temporal temporales también presentan marcado de terminales siendo de menor profusión que en las



cortezas temporales inferiores. Otra característica de las regiones del PulM exploradas con nuestros depósitos de marcado anterógrado es que no inervan áreas corticales sensoriales primarias como son: las áreas somatosensoriales 1/2 y 3 a-b, auditivas y visuales primarias.

De esta forma, en los casos (21izq, 22izq, 22dx y 21dx), que tenían depósitos caudales, el componente de inervación al lóbulo temporal, tanto su región inferior como mesial, constituye la totalidad de su inervación en corteza. Sin embargo, en los casos con depósitos en PulM localizados más rostrales (04izq, 12izq, 11dx, 11izq, 13dx, 12dx y 13izq), observamos la inervación sale del lóbulo temporal para inervar también múltiples áreas de los lóbulos corticales parietal y frontal, que precederemos a resumir a continuación.

El lóbulo frontal presenta mayor densidad relativa de inervación en áreas corticales de la región ventrolateral de la corteza prefrontal, seguido por escasa inervación en áreas premotoras ventrales. En cuanto al componente dirigido a corteza dorsolateral podemos afirmar que el área 8aV es la que presenta más consistencia entre los casos. Por último, el componente orbitofrontal está compuesto principalmente por axones aislados.

En el lóbulo parietal, los casos presentan inervación variable que se encuentra centrada en dos focos; en regiones inferiores (áreas PG, PFG y PG) y en regiones homólogas a las que se localizan dentro del SIP de primates que lo presentan (en áreas MIP y AIP principalmente).

Observamos inervación en la región cingular posterior en pocos casos, que son los que presentaban depósitos más rostrales en PulM (casos 04izq, 12izq, y 11dx), la inervación se encuentra en las áreas 23 a y b.

En la región insular observamos un predominio en las áreas localizadas en la región rostral del labio superior del surco lateral (áreas Gu, GI y DI), siendo más intenso en el caso 13dx.

Finalmente, la inervación en el lóbulo occipital también es ligera pero consistente en la mayoría de estos casos, siendo más constante la inervación de las áreas pertenecientes a la corriente ventral, áreasvV4 (VLA) y V3. Por el contrario, en áreas occipitales de la corriente dorsal apenas se aprecia inervación leve en el área V6 (DM).

**Tabla 8. Resumen de la distribución cortical y subcortical de los axones marcados en los experimentos de trazado anterógrado analizados.**

La escala de rojos indica la densidad relativa de inervación observada dentro de cada caso. Los puntos indican la presencia de axones aislados que no forman un parche de inervación en corteza claro.

## RESULTADOS

TABLA 1. Resumen de la distribución del marcado axonal anterógrado

			04dx	04izq	12izq	11dx	11izq	13dx	12dx	13izq	14izq	20izq	14dx	15izq	17izq	19dx	21izq	22izq	22dx	21c
FRONTAL	Prefrontal dorsolateral	A10 A46V A46D A8b A8aV A8aD A11																		
	Prefrontal ventrolateral	A47L A47M A45 A47O ProM																		
	Orbitofrontal	A11 A13L A13M OPro A14R OPAI AO A13a A13b																		
	Prefrontal medial	A32 A14R/C A25 A24a A24b A24c A24d																		
	Motor y premotor	A4ab A4c A6M A6DR A6DC A6Va A6Vb A8C																		
INSULAR		Gu GI DI AI A13b PalM IPro																		
CINGULAR	Posterior	A29a-d A30 A23a A23b A31 A23V PGM A32																		
PARIETAL	Somatosensorial	A1/2 A3a-b S2PR S2PV S2E S2I																		
	Posterior	PF PFG PG OP PE PEC MIP LIP AIP TPI																		
TEMPORAL	Auditivo	AuCM AuAL AuRPB AuCL																		
	Lateral	PGs FS TPO SIR MST																		
	Inferior	TE1 TE2 TE3 TEO TF																		
	Ventral	TFO TL TLO TH A36 A35 Ent Pir																		
OCCIPITAL		V5(MT) V4(MTC) V4(VLA) V3A A19DI V6A(PPM) V6(DM) A19M V3(VLP) ProSt V2 V1																		

■ densidad alta ■ densidad media ■ densidad baja · axones ocasionales

Respecto a los casos de Pull (14izq, 14dx, 15izq y 20izq) tienen un patrón principalmente en lóbulo occipital y en temporal inferior caudal. Observamos invasión en regiones corticales tanto de la corriente visual ventral como de la dorsal. Sin embargo, la mayor intensidad de invasión se dirige a áreas corticales de la corriente ventral (V4(VLA) y V3(VLP)). De la corriente visual dorsal las áreas que reciben invasión moderada son 19DI, V6(DM) y V6A(PPM). Por último, ya dentro del lóbulo temporal la región satélite de MT, MTC, que pertenece a la corriente dorsal, recibe invasión notable desde estos depósitos.

En la región ventral y medial del PulM, que solo ha sido analizada parcialmente con un único caso (caso 12dx), apreciamos que inerva en regiones asociativas auditivas (áreas del “belt” y “parabelt”) y polisensoriales de la corteza temporal superior. Estas áreas localizadas en la región superior del lóbulo temporal, no reciben inervación de las regiones dorsales y centrales del PulM, como demuestran el resto de casos realizados. Además, también se observa un foco de inervación en la corteza insular; en áreas insulares granulares y disgranulares. En la corteza prefrontal apreciamos inervación dispersa principalmente hacia capa 1, asociada al reborde de la corteza prefrontal ventrolateral y en corteza prefrontal anterior (área 10), también observamos un componente de inervación en la corteza prefrontal dorsolateral. Por último, hay escasa inervación en corteza cingular posterior.

Otro caso que, en base a su diferente inervación en corteza, llama la atención, es el caso 19dx que tiene el depósito más medial. En la corteza prefrontal la inervación se dirige a regiones mediales y orbitofrontales con ausencia del componente a región ventrolateral presente en la mayoría de los demás casos. En temporal inerva la región más anterior o temporopolar.

Finalmente, el caso de PulA, presenta inervación restringida al lóbulo parietal posterior lateral y medial con importante inervación en precuneus rostral (PEC) y caudal (PGM). Además, también hay inervación patente en gran extensión de la corteza cingular posterior.

### 2.3. Análisis cuantitativo de las varicosidades axónicas en áreas representativas de los lóbulos parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventrolateral

La gran mayoría de las varicosidades observadas eran del tipo *en passant* ocasionalmente se observaron varicosidades terminales.

#### *2.3.1. Estimación estereológica de la distribución laminar de las varicosidades en transectos corticales*

Realizamos el recuento del número absoluto de varicosidades dentro de tres transectos en las zonas de máxima inervación de los parches de axones marcados localizados en regiones de la corteza parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventrolateral. Estas zonas de inervación variaban ligeramente entre los 3 animales analizados, por ello la zona en la que se realizamos los transectos es ligeramente distinta. Los transectos realizados en la corteza parietal posterior se localizaron principalmente en las áreas PFG y PG. En corteza temporal, todos los transectos se localizaron en distintas alturas del área TE3. En la corteza prefrontal ventrolateral,

el plexo de invasión de mayor densidad presentó mayor variabilidad entre los animales, de modo que realizamos los transectos en la región caudal del área 47L en el caso 13dx y en una localización dentro del área ProM en los casos 04izq y 13dx.

Con la estimación media del número de varicosidades dentro de cada BIN realizamos perfiles de su variación en profundidad a lo largo de la corteza. A continuación, agrupamos los valores de los BINes a las capas corticales que les correspondía y de esa forma obtuvimos la distribución en porcentaje de las varicosidades a lo largo de las capas y de la ratio entre la densidad por capa y la densidad total de varicosidades.

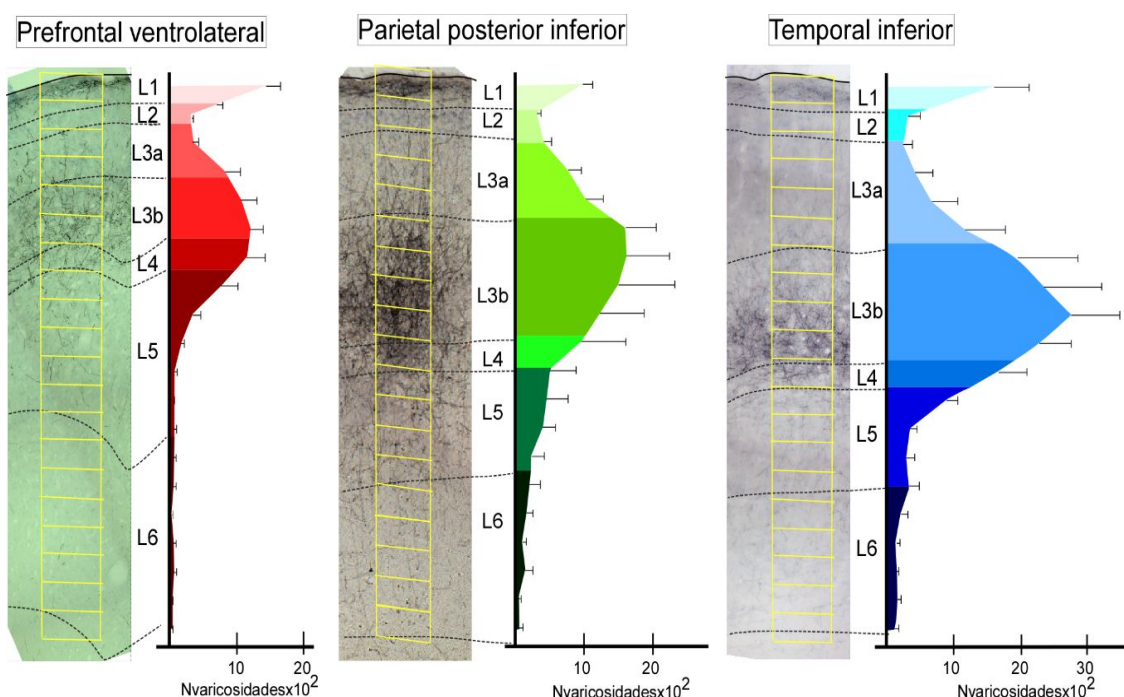
#### (1) Perfil de variación del número de varicosidades en el grosor de sustancia blanca

Los valores medios del número estimado de varicosidades, así como sus desviaciones estándar de la media (SEM) están recogidos en la Tabla 9. En esta tabla también se especifican los valores del coeficiente de error del estimador estereológico (CE). Estos datos fueron utilizados para realizar una representación gráfica o perfil de cómo varían estos valores en la profundidad de corteza **Figura 34**.

Podemos observar en los perfiles por cada área que siempre se presentan dos máximos que formando dos picos. El valor máximo del primer pico, justo adyacente a la superficie pial se localiza para todas las áreas en el BIN1, sin embargo, el segundo pico se encuentra a distintas alturas del transecto debido a que las áreas corticales varían en su grado de oblicuidad. Siendo la corteza prefrontal ventrolateral la que mayor oblicuidad presenta debido a su posición, en el opérculo del lóbulo frontal. Debido a esto, pasaremos a describir los perfiles por cada área analizada.

En corteza prefrontal observamos que el máximo localizado en el BIN 1 es el punto que tiene mayor número de varicosidades de todo el transecto. El otro máximo, localizado en capas intermedias, se encuentra en el BIN 6 que presenta el mayor valor de todo el transecto, junto con los BINes adyacentes conforman un pico con una progresión suave. Observamos un valle a nivel de las capas supragranulares que presenta un número moderado de varicosidades teniendo su punto mínimo en el BIN2. Avanzando hacia sustancia blanca, después del máximo en capas intermedias observamos que el número de varicosidades disminuye progresivamente hasta alcanzar niveles muy bajos a partir del BIN 14 hasta el final del transecto. Otra característica de los transectos de esta área es que sus valores son los menores respecto a las otras áreas analizadas, lo que nos indica que esta zona es la que recibe menor cantidad de invasión respecto a las demás.

En el caso del transecto localizado en la corteza parietal posterior observamos un máximo en capa 1 que a diferencia del caso en corteza prefrontal no es el máximo absoluto. El otro máximo, que es el absoluto, localizado en capas intermedias se encuentra desplazado hacia el BIN 7. Este máximo junto con los BINes 7 y 8 conforman un pico con una progresión suave. Observamos un valle a nivel de las capas supragranulares similar al descrito en el área prefrontal. En los BINes que se continúan a partir del BIN7 observamos que los valores disminuyen de forma acusada hasta el BIN12 y a partir de allí se mantienen en números bajos hasta el final del transecto.



**Figura 34. Perfiles de distribución de las varicosidades axonales en los transectos en lo que se ha realizado la estimación.**

Hemos realizado la representación gráfica del perfil de distribución del número de varicosidades estimadas a lo largo del espesor cortical dentro de los transectos. En distintas gamas de color se ilustran las diferentes capas de la corteza. Los datos representados son la media por área con su desviación estándar (para ver los datos estimados en cada BIN cf. Tabla 9). En gamas de rojo se han representado los datos estimados en áreas de la corteza prefrontal ventrolateral, en gama de verdes los datos de áreas de la corteza parietal posterior y en gama de azules los datos de la corteza temporal inferior. A la izquierda de cada perfil hemos puesto un ejemplo de transecto utilizado junto con el transecto realizado y la laminación en capas de la corteza.

Finalmente, los datos obtenidos en corteza temporal inferior nos muestran que esta área recibe mayor número de varicosidades desde los depósitos de BDA analizados. El perfil nos muestra dos picos, el primero localizado en el BIN1 de forma similar a lo obtenido en las otras

## RESULTADOS

áreas. El máximo absoluto se localiza en el segundo pico correspondiéndose con el dato del BIN9, este pico tiene una progresión rápida comenzando su crecimiento desde el BIN3 y terminando su decrecimiento en el BIN12. A partir de este BIN los datos se mantienen formando una recta horizontal con valores mínimos.

**Tabla 9. Número de varicosidades estimadas por BIN en regiones de la corteza parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventrolateral**

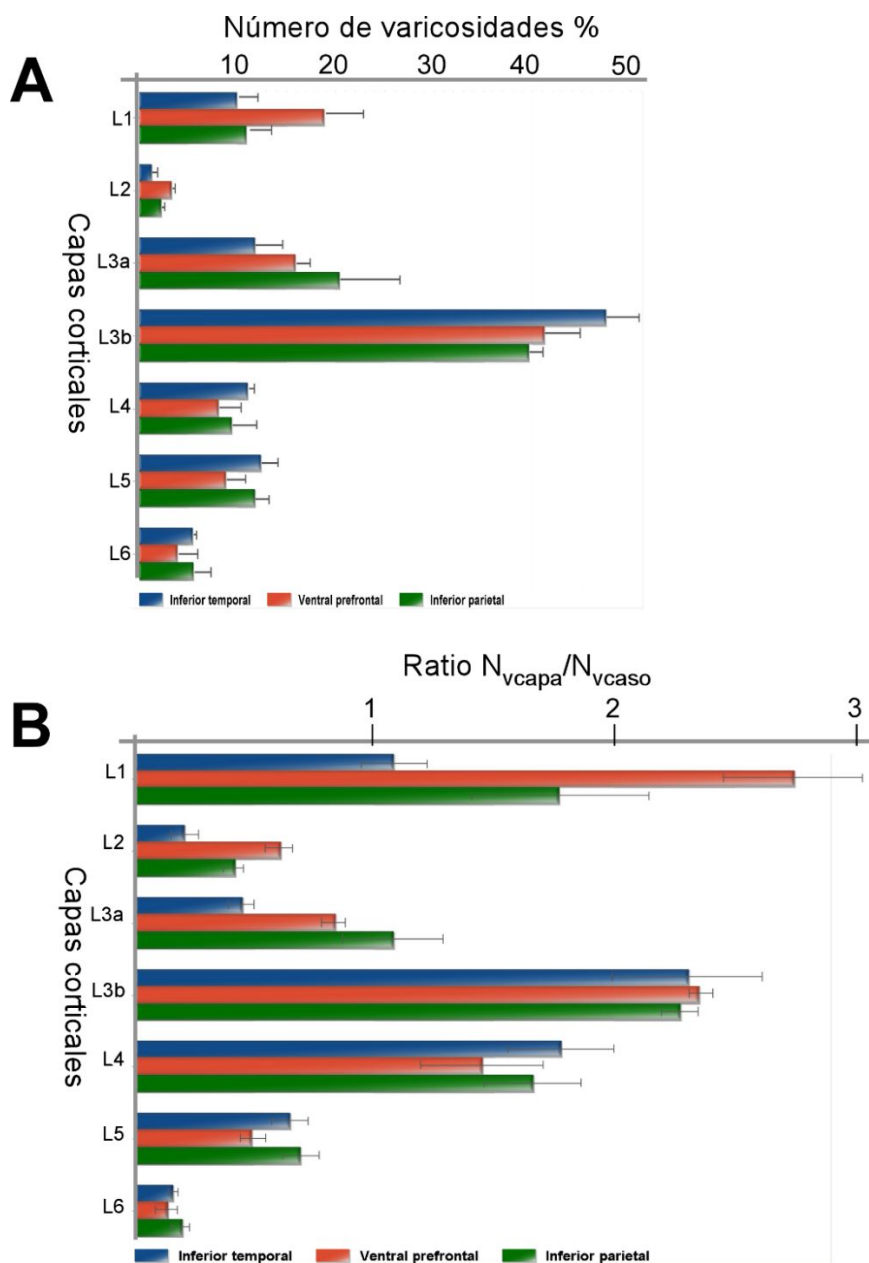
Número de varicosidades por BIN									
	Parietal inferior posterior			Prefrontal ventrolateral			Temporal inferior		
	Media	SEM	CE(NV)	Media	SEM	CE(NV)	Media	SEM	CE(NV)
<b>BIN 1</b>	984	142,71	0,11	1458	213,23	0,09	1606,33	529,68	0,07
<b>BIN 2</b>	307,33	73,14	0,18	303	23,43	0,17	318,33	198,06	0,19
<b>BIN 3</b>	414	119,06	0,16	350,33	89,33	0,18	239	159,56	0,22
<b>BIN 4</b>	768	192,28	0,12	834	229	0,12	426	272,84	0,18
<b>BIN 5</b>	1015,33	262,82	0,1	1071	239,19	0,1	664	395,98	0,14
<b>BIN 6</b>	1606,33	447,04	0,09	1203	195,62	0,09	1163,67	609,42	0,11
<b>BIN 7</b>	1616,33	627,33	0,09	1151,33	276,17	0,1	1968	887,8	0,07
<b>BIN 8</b>	1507,67	817,43	0,1	771,33	256,78	0,13	2341,33	868,19	0,07
<b>BIN 9</b>	1229,33	649,29	0,12	353,67	121,83	0,19	2762	724,84	0,06
<b>BIN10</b>	956	651,8	0,14	181,67	51,17	0,25	2280,67	472,56	0,07
<b>BIN11</b>	504,33	384,34	0,24	79,33	45,68	0,54	1669	428,72	0,08
<b>BIN12</b>	455	319,28	0,22	75	15	0,36	902	172,4	0,09
<b>BIN13</b>	399	192,63	0,18	76,67	44,17	0,21	340,33	118,5	0,17
<b>BIN14</b>	241	186,76	0,38	69,33	45,11	0,22	292,33	128,6	0,19
<b>BIN15</b>	205	158,62	0,35	67,33	41,65	0,57	339,33	150,36	0,16
<b>BIN16</b>	164	94,65	0,31	34,33	29,95	0,44	219,67	103,85	0,21
<b>BIN17</b>	107	59	0,37	63	46,18	0,25	153	58,97	0,23
<b>BIN18</b>	150,67	110,77	0,5	70,67	47,72	0,51	140,33	54,36	0,27
<b>BIN19</b>	42	42	0,09	45,33	22,45	0,54	167	51,96	0,21
<b>BIN20</b>	58	58	0,08	48	16,7	0,47	121	62,88	0,35

*SEM: error estándar de la media; CE: coeficiente error de la estimación*

Respecto a la precisión del estimador (CE), observamos que en algunos BINes, localizados en las capas infragranulares y en los BINes 2 y 3, nos ha salido por encima de lo aceptable: que es el valor 0,1. Esto se debe principalmente al bajo número de impactos conseguido en el recuento producto de la propia distribución laminar de las varicosidades, se observan que en estas capas los axones son de paso dejando pocas varicosidades.

(2) Densidad y número de varicosidades por capa de los transectos muestreados.

Debido a que los transectos son construcciones artificiales cuyo objetivo es permitir la cuantificación en áreas corticales asociativas en el lugar de máxima inervación de axones marcados, decidimos agrupar estos datos en las capas corticales que les corresponden para facilitar una descripción de la distribución laminar del número de varicosidades en la corteza. Los valores medios de los datos agrupados por capa, así como su desviación estándar y coeficiente de error, están recogidos en la Tabla 10. A partir de estos datos realizamos histogramas de barras tanto de su porcentaje como de la ratio entre la densidad por capa entre la densidad total.



**Figura 35. Medias y desviaciones estándar de los datos estereológicos por BIN agrupados en las capas corticales que les corresponden.**

**A.** Distribución del porcentaje del número de varicosidades estimadas en las distintas capas corticales.

**B.** Distribución de la ratio de densidad normalizado por el total de cada caso a lo largo de las capas corticales. En azul se representan los datos obtenidos en corteza temporal inferior, en rojo los datos de corteza prefrontal ventrolateral y en verde los datos obtenidos en parietal inferior.

Empezaremos describiendo el porcentaje de varicosidades por área (**Figura 35 A**). Podemos observar que dentro de los transectos que realizamos en la zona de máxima inervación del parche de marcado, los axones TC distribuyen alrededor del 40% de sus varicosidades en la capa 3b (en las cortezas temporal inferior:  $47,48 \pm 3,24$ , prefrontal ventrolateral:  $41,23 \pm 3,39$  y parietal inferior:  $39,61 \pm 1,17$ ). En el resto de capas, las varicosidades se distribuyen dejando en la mayoría de ellas alrededor del 10%. Los valores obtenidos en cada una ellas están recogidas en la Tabla 10, las excepciones a esa tendencia se observan en la capa 3a de las áreas prefrontal ( $15,87 \pm 1,47$ ) y en parietal inferior ( $20,34 \pm 1,6$ ).

Por último, en la capa 6 obtenemos valores muy bajos cercanos al 5% (en las cortezas temporal inferior:  $5,45 \pm 0,43$ , prefrontal ventrolateral:  $3,9 \pm 1,82$  y parietal inferior:  $5,58 \pm 1,6$ ). En cuanto a las ratios de densidad obtenidas (**Figura 35 B**), empezaremos destacando el cambio entre la relación de los valores entre capas. Llama la atención el incremento del valor de la ratio en capa 1 respecto al resto de capas. La causa de este incremento se debe a que la densidad es inversamente proporcional al volumen de la capa. De forma que, si, por ejemplo, comparamos la densidad entre capa 1 y capa 3b a pesar de que la capa 3b tiene el triple de varicosidades respecto a la capa 1 el valor de densidad entre ambas se iguala al ser el volumen ocupado en capa 1 tres veces menor respecto a la otra capa.

Respecto a las comparaciones entre las ratios dentro de capa área, podemos apreciar

**Tabla 10. Porcentaje de varicosidades en cada capa por área (%N<sub>capa</sub>) y ratio de la densidad de varicosidades por capa con respecto a la densidad total (N<sub>vcapa</sub>/N<sub>vtotal</sub>)**

	%N <sub>capa</sub>			Ratio N <sub>vcapa</sub> /N <sub>vTOTAL</sub>		
	TEMP INF	PREF VENT	PAR INF	TEMP INF	PREF VENT	PAR INF
	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM
L1	9,97 ± 1,87	18,78 ± 3,75	10,94 ± 2,12	1,08 ± 0,21	2,75 ± 0,45	1,77 ± 0,57
L2	1,3 ± 0,64	3,3 ± 0,3	2,28 ± 0,22	0,21 ± 0,09	0,61 ± 0,09	0,42 ± 0,06
L3a	11,82 ± 2,76	15,87 ± 1,47	20,34 ± 1,6	0,45 ± 0,08	0,84 ± 0,08	1,08 ± 0,32
L3b	47,48 ± 3,24	41,23 ± 3,39	39,61 ± 1,17	2,31 ± 0,48	2,35 ± 0,08	2,27 ± 0,12
L4	11,04 ± 0,57	8,09 ± 2,11	9,42 ± 2,3	1,78 ± 0,34	1,46 ± 0,39	1,66 ± 0,31
L5	12,4 ± 1,58	8,82 ± 1,91	11,82 ± 1,23	0,65 ± 0,12	0,50 ± 0,08	0,69 ± 0,12
L6	5,45 ± 0,43	3,9 ± 1,82	5,58 ± 1,6	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,07	0,21 ± 0,06

ratios significativas entre los valores obtenidos en las capas 1 y 2 en todas las áreas analizadas,



que son apreciablemente mayores en la primera (TempInf 5,14; PrefVent 4,5; ParPost 4,21 veces mayor). Entre las capas 1 y 3b la única ratio significativa se produce en TempInf siendo 2,13 veces mayor en capa 3b respecto a la capa1. El valor en la capa 3b es 5,13 veces mayor respecto a la capa 3a en TempInf, en el resto de áreas es 2,79 mayor en PrefVent y 2,1 mayor en ParPost. Finalmente, los valores en capa 5 son 4,06 veces mayores en TempInf, 3,33 en PrefVent y 3,28 en ParPost respecto a la capa 6.

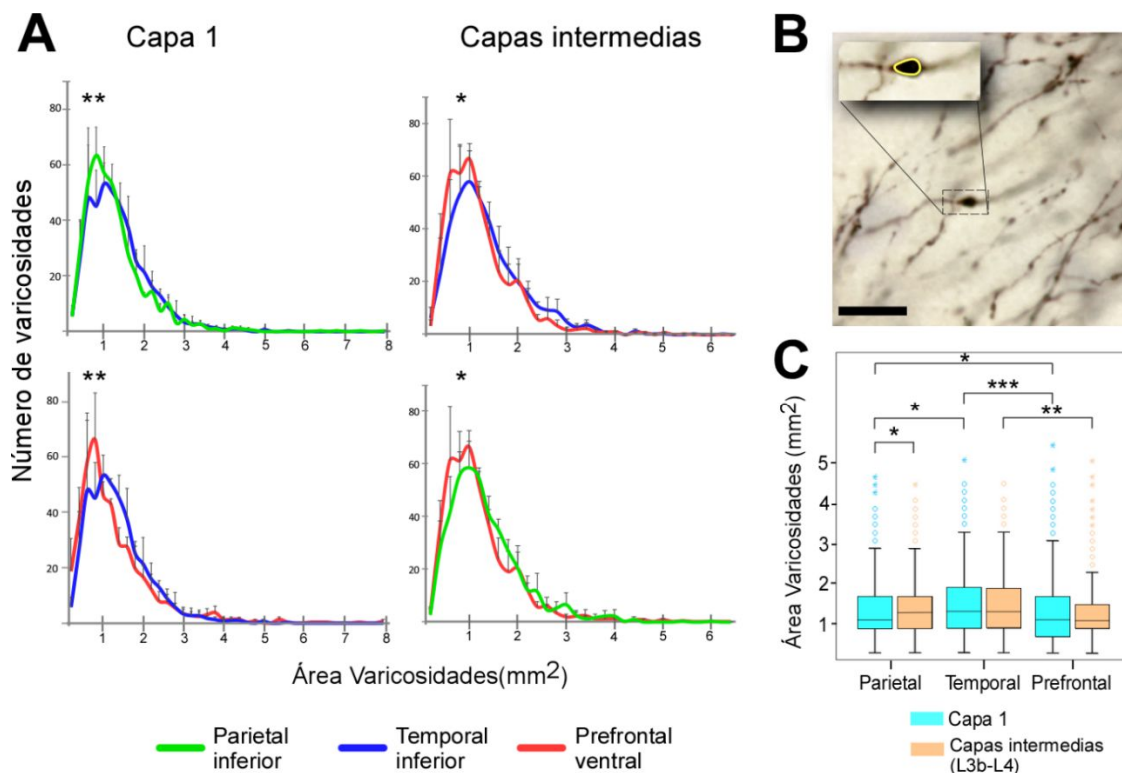
### *2.3.2. Comparación del tamaño de las varicosidades entre capa 1 y capas intermedias.*

La resolución de los axones marcados BDA fue de excelente calidad, lo que nos permitió realizar cuantificaciones del área de máxima proyección de las varicosidades en corteza (**Figura 36 B**). Debido a que a 100x era imposible saber en qué capa cortical se están realizando las mediciones con exactitud, decidimos realizar las mediciones en capa1, claramente identificable debido a su proximidad con la superficie pial, y en capas intermedias que reconocemos como las regiones densamente marcadas en las que se incluyen regiones de capa 3b y 4.

De cada área y capa obtuvimos mediciones en tres casos diferentes con depósitos en PulM similares. Para realizar las comparaciones estadísticas utilizamos las medias de las poblaciones en cada área y calculamos el error estándar de la media (SEM) de estas poblaciones. Los parches en los que se realizó la toma de datos se correspondieron a los mismos en los que se realizaron los procedimientos de estereología. Las medias $\pm$ SEM en capa 1 que obtuvimos fueron 1,34 $\pm$ 0,035 en corteza ParPost, 1,45 $\pm$ 0,037 en TempInf y 1,33 $\pm$ 0,041 en PrefVent. En capas intermedias las medias $\pm$ SEM fueron 1,36 $\pm$ 0,03 en ParPost, 1,44 $\pm$ 0,035 en TempInf y 1,33 $\pm$ 0,032 en PrefVent.

Representamos gráficamente en polígonos de frecuencia la distribución del tamaño de las varicosidades de todas las poblaciones medias (**Figura 36 A**). Además, realizamos la representación gráfica de los datos de cada población por medio de diagramas de cajas y bigotes ya que nos permiten visualizar las características principales de la distribución como son las medianas, valores atípicos, máximo, mínimo y el rango intercuartílico (**Figura 36 C**).

Previamente a la comparación estadística de las medias, comprobamos la normalidad de cada una de las distribuciones con el test de Shapiro-Wilk cuyo resultado fue significativo (p-valor=0,00) en todas las poblaciones, esto quiere decir que aceptamos la hipótesis nula de que las poblaciones no tienen una distribución normal. Aplicamos los test no paramétricos Kolmogorov-Smirnov (estadístico Z) de dos muestras para comparar la bondad de ajuste entre las distribuciones y la U de Mann-Whitney para comparar las medianas entre sí.



**Figura 36. Comparación del tamaño de las varicosidades en la capa 1 y en capas intermedias de las cortezas parietal posterior, temporal inferior y prefrontal ventrolateral.**

**A:** Polígonos de frecuencias del tamaño de las varicosidades en capa 1 izquierda y en capas intermedias para las regiones corticales analizadas, en asteriscos se indica las comparaciones de las distribuciones que fueron significativas.

**B:** Imagen a gran aumento que muestra un campo cortical con varicosidades marcadas que se pueden observar nítidamente, lo que posibilita marcar el área de máxima proyección (línea amarilla) de cada una de ellas. Ampliación de una varicosidad relativamente grande que está rodeada de múltiples varicosidades pequeñas.

**C:** Diagramas de cajas y bigotes que muestran la dispersión de las poblaciones, así como sus medianas, máximos y mínimos y datos raros. En asteriscos están indicadas las comparaciones de medianas que fueron significativas.

Barra de calibración: 10µm

Obtuvimos diferencias significativas entre las distribuciones medias del tamaño de las varicosidades en capa 1 entre las áreas TempInf y PrefVent ( $Z=1,95$ ;  $p\text{-valor}=0,001$ ) y en capas intermedias entre las áreas ParPost y PrefVent ( $Z=1,4$ ;  $p\text{-valor}=0,04$ ) y entre TempInf y PrefVent ( $Z=1,509$ ;  $P\text{-valor}=0,021$ ). Respecto a la comparación de las medianas, obtuvimos diferencias significativas dentro del área parietal entre capas ( $U=91823$ ;  $P\text{-valor}=0,047$ ). Comparando los datos de capa 1 entre las diferentes áreas obtuvimos diferencias significativas entre las áreas parietal y temporal ( $U=75398$ ;  $P\text{-valor}=0,014$ ) y entre las áreas temporal y prefrontal ( $U=71701$ ;  $P\text{-valor}=0,00$ ). Finalmente, en capas intermedias se aprecian diferencias entre las áreas parietal y prefrontal ( $U=77153$ ;  $P\text{-valor}=0,003$ ) y temporal y prefrontal ( $U=750067$ ;  $P\text{-valor}=0,001$ ). Estas diferencias están representadas como asteriscos (un asterisco:  $[0,05-0,01]$ , dos asteriscos:  $(0,01)$  y tres asteriscos  $(0)$ ) en los polígonos de frecuencias de las distribuciones del tamaño de las

varicosidades (**Figura 36 A**) para el test de Kolmogorov-Smirnov y en los diagramas de cajas y bigotes de las distribuciones (**Figura 36 B**).

### 3 MAPEO EN PULVINAR MEDIAL BASADO EN DEPÓSITOS DE TRAZADORES RETRÓGRADOS EN CORTEZA

A parte de en algunas subdivisiones del complejo pulvinar, observamos somas marcados en otros núcleos talámicos como en el DM en su subdivisión lateral principalmente y en núcleos intralaminares. Sin embargo, como el objetivo de este trabajo es la topografía de PulM, no los mencionaremos en las descripciones del marcado.

#### 3.1. Depósitos realizados en la corteza prefrontal ventrolateral

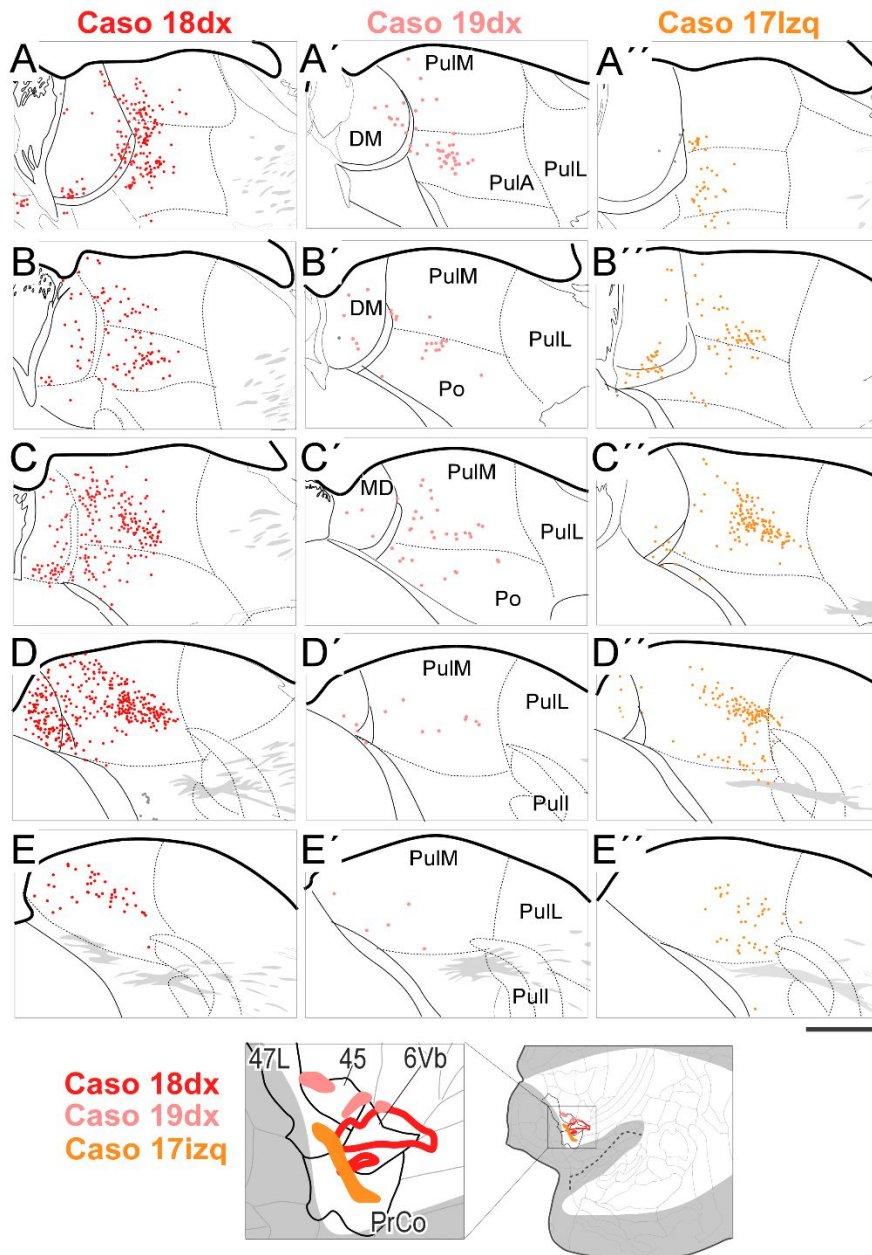
En PrefVent se realizaron 9 depósitos con trazadores retrógrados, de estos, 6 fueron casos válidos, es decir, fueron casos que no presentaron contaminación en sustancia blanca y cuyos somas fueron fácilmente identificables en tálamo. En función de su tamaño y singularidades en cuanto a localización hemos elegido 3 casos representativos (**Figura 37**).

En el caso 18 obtuvimos un depósito de tamaño grande que abarcó gran parte del área premotora ventral 6Vb. Observamos multitud de somas marcados en PulM, el patrón de somas marcados cambiaba conforme progresábamos a niveles caudales del núcleo. En el nivel más rostral representado (**Figura 37 A**), la población de neuronas marcadas se encontraba en la parte más proximal de los núcleos PulM y PulA. En el siguiente nivel, el PulA que presentaba somas marcados más o menos dispersos en su parte central y en PulM se apreciaban somas en su parte medial principalmente (**Figura 37 B**). En los siguientes niveles el grupo de somas marcados se iba organizando en una banda diagonal dentro del PulM (**Figura 37 D**), en la parte medial se siguen observando elementos marcados un poco más dispersos. En el último nivel representado se observan somas en menor densidad en la banda diagonal mencionada anteriormente (**Figura 37 E**).

El depósito del caso 19, fue de menor tamaño respecto a los otros depósitos representados y se localizó principalmente en el área 45 de la corteza prefrontal ventrolateral. Apreciamos que en niveles anteriores donde coexiste el PulA, los somas marcados se agrupan formando focos en su parte central (**Figura 37 A`-B`**). En los siguientes los somas marcados se localizan de forma dispersa y leve en PulM en su región medial principalmente (**Figura 37 C`**) y desaparece rápidamente hasta ser muy escaso en los siguientes niveles (**Figura 37 D´, E´**).

**Figura 37. Localización de los somas marcados retrógradamente en PulM tras realizar depósitos de trazadores en corteza prefrontal ventrolateral.**

Progresión rostro-caudal de los niveles representativos dentro del PulM con la localización de los somas marcados, en tres casos distintos con depósitos en el mismo lóbulo. A-E: Representación en color rojo oscuro de los somas marcados del caso 18 que presentaba un depósito grande en la corteza prefrontal ventrolateral centrado en el área 6Vb. A'-E': Representación en color rosa de los somas marcados en el caso 17 que tenía un depósito pequeño localizado en el área 45. A''-E'' representación en color naranja de los somas en pulM tras realizar un depósito en la región intermedia de las áreas 47L y en PrCo. Abreviaturas: (cf. Lista de abreviaturas). Barra de calibración: 2mm.



Terminamos esta descripción de la topografía de las poblaciones neuronales que proyectan a PrefVent, con el caso que presenta el depósito más ventral; el caso 17izq, que se extiende desde área 47L a gran parte de la región intermedia del área PrCO. Podemos observar que al igual que en los casos anteriores, en el nivel más rostral los somas marcados se encuentran en la parte medial del PulA (**Figura 37 A''**). En los siguientes niveles la población de neuronas

marcadas se agrupa progresivamente y avanza desde la parte ventral del PulM (**Figura 37 B''**), hacia su región central formando una banda oblicua de marcado moderado, más densa en la región distal del núcleo (**Figura 37 C'' y D''**). Esta banda se disgrega y termina progresivamente (**Figura 37 E''**).

### 3.2. Depósitos realizados en el lóbulo parietal

En ParPost realizamos 8 depósitos de los cuales dos no se analizaron; el 14izq por mal transporte del trazador que conllevaba dificultad para distinguir los somas en tálamo y el 27dx que se localizó en corteza somato sensorial y que por tanto no tuvo somas marcados en PulM.

De los casos válidos dos se localizaron en áreas corticales de la región inferior de ParPost PFG y PG (17dx y el 26dx), otros tres casos se localizaron en áreas asociadas al SIP: AIP y LIP (20izq, 21izq y 17izq), y por último un caso resultó en un depósito de tamaño grande que abarcaba desde PFG hasta LIP (18izq). Entre estos casos hemos seleccionado tres y los hemos colocado en la misma figura en niveles aproximadamente similares para comparar los cambios que se observan entre los distintos patrones de marcado (**Figura 38**).

El caso 18dx presentaba el depósito más grande de todos con gran cantidad de somas marcados tanto en PulM como en PulA. En el nivel más anterior, apreciamos una banda densa que se extiende dorsoventralmente en la región central del PulM. Además, se observan somas dispersos a ambos lados, que distalmente entran en PulL y en PulA (**Figura 38 A**). En el siguiente nivel se aprecia un foco denso de somas que ocupa gran parte del PulM y PulA, se observan también somas dispersos en la región dorsal del PulL (**Figura 38 B**). En el siguiente nivel desaparece PulA que es sustituido por Po que presentaba una banda moderada de somas en la región que limita con PulM. Dentro de PulM, se observan gran cantidad de somas marcados y en PulL quedan elementos dispersos y poco numerosos (**Figura 38 C**). En los dos niveles posteriores, el marcado se encuentra en el tercio distal del PulM, formando una banda horizontal que se adentra en la región superior del PulL hasta terminar desapareciendo (**Figura 38 D y E**).

El caso 17dx fue el más ventral de los depósitos analizados, localizado en el límite entre PFG y PG. Observamos que el marcado se queda en niveles más rostrales con una densidad menor de somas respecto al anterior caso. En el primer nivel apreciamos que gran parte de la extensión del PulM presenta somas dispersos, en PulA se observan somas en escaso número (**Figura 38 A'**). En el siguiente nivel las neuronas marcadas se encuentran localizadas en la mitad superior del PulM, en la región distal de PulA se observan algunos somas marcados (**Figura 38 B'**). En el siguiente nivel, los somas marcados se organizan en agrupaciones con poca densidad,

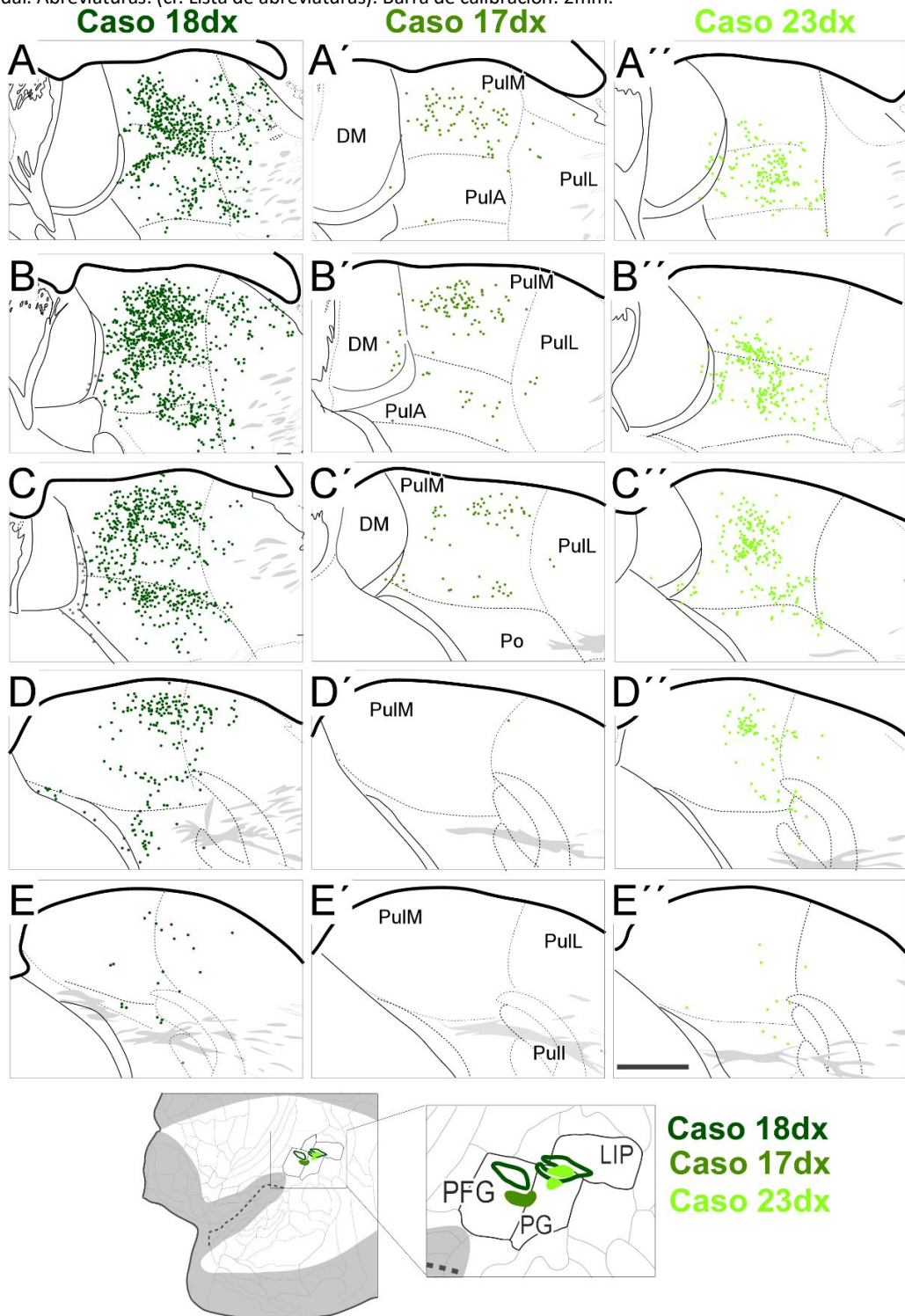
**Figura 38. Localización de los somas marcados retrógradamente en PulM tras realizar depósitos de trazadores en cortezas de la corteza parietal posterior.**

Progresión rostro-caudal de los niveles representativos dentro del PulM con la localización de los somas marcados, en tres casos distintos con depósitos en áreas de la corteza parietal posterior. Los casos están representados en gamas de verde.

**A-E:** Representación de los somas marcados del caso 18 que presentaba un depósito grande.

**A'-E':** Representación de los somas marcados en el caso 17 que tenía un depósito pequeño localizado entre el límite entre las áreas PFG y PG.

**A''-E'':** Representación de los somas en PulM tras realizar un depósito en la corteza parietal posterior inferior caudal. Abreviaturas: (cf. Lista de abreviaturas). Barra de calibración: 2mm.



dos en la región dorsal y otro en la región ventral (**Figura 38 C'**).

Por último, el caso 23dx presentaba un depósito más dorsal y caudal respecto al anterior, estando localizado entre las áreas PG y LIP. Observamos que, en los dos niveles más rostrales, el patrón de este depósito se opone al del 17dx, es decir, los somas marcados se localizan en una posición ventral respecto al otro depósito de forma que se concentran principalmente en PulA extendiéndose a la región inferior del PulM (**Figura 38 A'' y B''**). En los siguientes niveles, los elementos marcados se encuentran al principio extendiéndose dorsoventralmente en el tercio central del PulM (**Figura 38 C''**) y a continuación cambian a una dirección vertical, en una localización más lateral del núcleo (**Figura 38 D''**). Finalmente, en el último nivel los somas marcados terminan de aparecer quedando somas dispersos en la región lateral del PulM.

### 3.3. Depósitos localizados en el lóbulo temporal

En el lóbulo temporal obtuvimos 7 depósitos. Uno de ellos, el caso 15izq, se localizó en la región temporal superior (área MST), sin embargo, el depósito entró en sustancia blanca lo que conllevó a su eliminación del análisis para evitar confusiones debido a la contaminación de fibras de paso desde otras cortezas. De los seis casos restantes, tres estaban localizados en las áreas TE3 y TE2 (24izq, 25izq y 29dx), el caso 21izq se localizó dorsalmente en TE3 con afectación del área FST y los últimos dos casos (19izq y 20izq) tuvieron depósitos localizados principalmente en TEO. Para el análisis hemos escogido casos representativos de estas localizaciones.

Para describir la topografía de las poblaciones neuronales que inervan la región inferior del lóbulo temporal, escogimos tres depósitos que se encontraban en una posición rostral (29dx), media (24dx) y caudal (21dx) dentro de dicha región cortical.

El caso 29dx, el más rostral de todos, se caracteriza por recibir inervación que empieza en la mitad superior de niveles rostrales del PulM (**Figura 39 A y B**), para abarcar toda la extensión dorso-ventral del PulM lateral, con continuación del Po adyacente (**Figura 39 C**). Finalmente, los somas marcados disminuyen en número en niveles caudales del PulM, donde ocupan la mitad medial del núcleo (**Figura 39 C**).

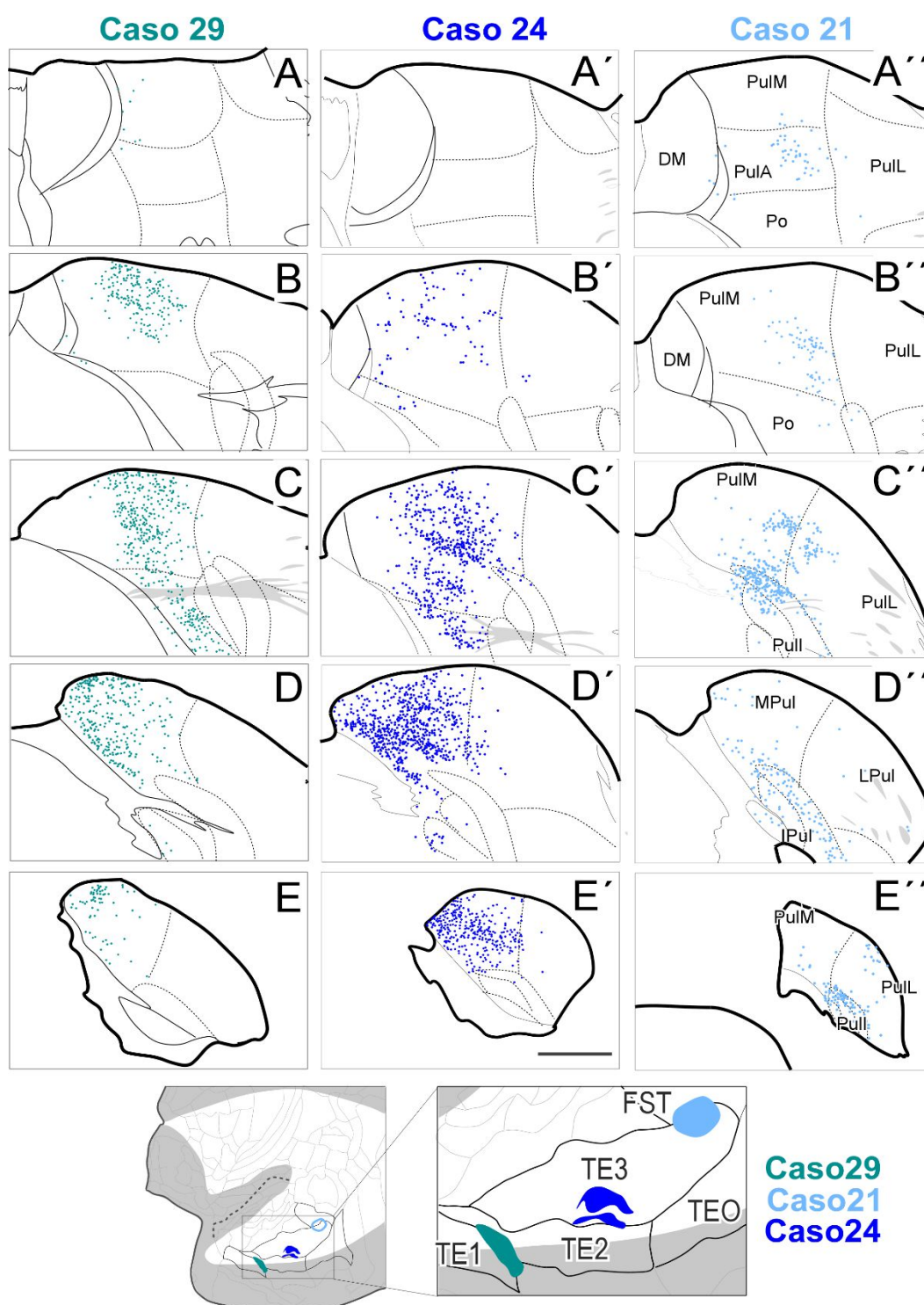
El siguiente caso en la progresión anteroposterior es el caso 24dx, se localiza exclusivamente en el área TE3 y presentaba somas marcados que al principio se localizaban de forma dispersa dentro del PulM (**Figura 39 B'**). En niveles posteriores los somas marcados se disponen formando una banda vertical en la región central del núcleo (**Figura 39 C'**). Finalmente, observamos gran cantidad de somas hasta niveles muy caudales, que forman un foco de gran densidad (**Figura 39 D' y E'**).



Por último, el caso más caudal, caso21dx, cuyo depósito presentó una localización más dorsal respecto a los otros casos. Podemos apreciar que los somas marcados empezaban en niveles anteriores, localizados lateralmente en PulA (**Figura 39 A''**). En el próximo nivel representado los somas marcados se disponen en una banda vertical en la región lateral inferior del PulM (**Figura 39 B''**). Progresando caudalmente, observamos que los somas marcados se disponen en dos bandas diagonales, una dorsal que empieza en la parte distal del PulM y se adentra brevemente en PulL y una banda ventral que se localiza de forma densa en el Pullcm con marcaje disperso en Pullm, fuera de estas bandas observamos somas dispersos dentro del PulM centro-lateral (**Figura 39 C''**). En los dos últimos niveles caudales observamos que la banda dorsal desaparece y se mantiene la ventral siempre asociada a las subdivisiones del Pull reseñadas anteriormente, en PulM se observan células dispersas (**Figura 39 D'' y E''**).

De esta forma, podemos apreciar que dentro del PulM hay una progresión medio-lateral de la inervación dentro del PulM a las cortezas que conforman la región inferior del lóbulo temporal. Así, las regiones rostrales de la corteza inferotemporal; áreas TE1, TE2, reciben inervación exclusivamente desde el PulM que en niveles rostrales forman una banda en la mitad lateral del núcleo y en niveles caudales, la inervación se localiza medialmente. Conforme se desplaza caudalmente dentro de TE3, la inervación que es escasa en niveles rostrales del PulM, aumenta su densidad en regiones caudales del núcleo donde se localizan en gran parte de la extensión medio-lateral del PulM con adición de inervación que proviene del borde medial del PulL adyacente. Finalmente, en regiones caudales de TE3 dorsal con implicación del área FST la inervación que proviene desde PulM es moderada localizándose en su región lateral y con implicación en niveles rostrales del PulA y en niveles caudales del PulL y del Pull.

En resumen, podemos afirmar que la inervación a las áreas TE1, TE2 y TE3, es intensa en todos los casos que hemos analizado llegando a ser una de las principales aferencias talámicas de estas regiones corticales. En consonancia, hemos observado que sólo los casos 20izq y 21izq que tenían afectación de áreas fuera de TE3 (TEO y FST respectivamente) presentaron inervación desde Pull. Lo que parece sugerir una cierta exclusividad dentro del complejo pulvinar de conexiones desde PulM a las áreas que conforman TE.



**Figura 39. Localización de los somas marcados retrógradamente en PulM tras realizar depósitos de trazadores en cortezas del lóbulo temporal inferior.**

Progresión rostro-caudal de los niveles representativos del PulM con la localización de los somas marcados, en tres casos distintos con depósitos en distintas regiones de la corteza temporal inferior. Los casos están representados en gamas de azul

**A-E:** Representación de los somas marcados del caso 29 que presentaba un depósito anterior con afectación las áreas TE1 y TE2.

**A'-E':** Representación de los somas marcados en el caso 21 que tenía un depósito TE3 en su región central.

**A''-E'':** Representación de los somas en PulM tras realizar un depósito caudal en el área TE3 con afectación del área FST.

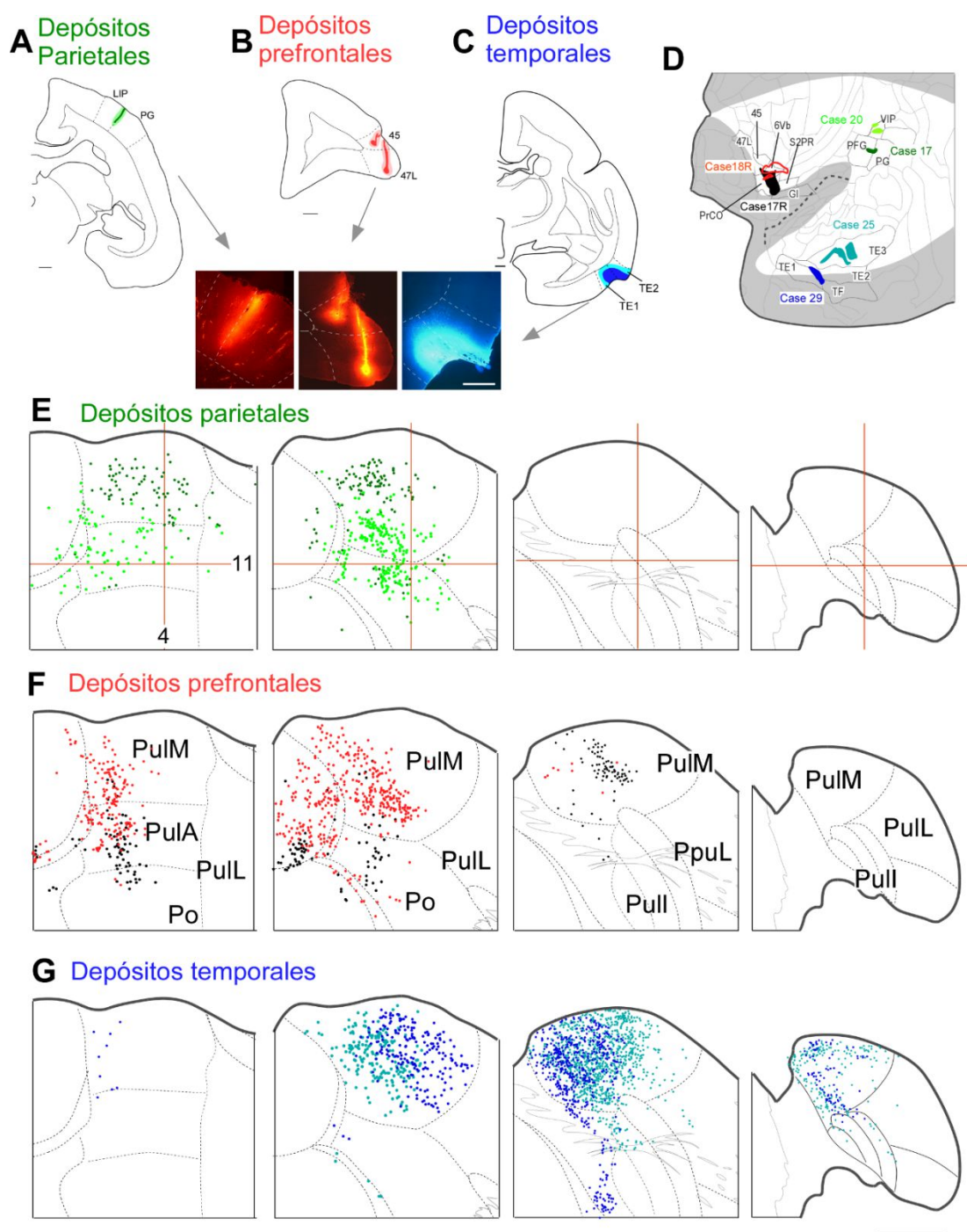
Abreviaturas: (cf. Lista de abreviaturas). Barra de calibración: 2mm.

### 3.4. Resumen de la topografía dentro del pulvinar medial

En este apartado intentaremos elaborar una síntesis de los datos retrógrados obtenidos para proponer un esquema general de la localización de las poblaciones neuronales dentro del PulM que proyectan a regiones de las cortezas prefrontal ventrolateral, temporal inferior y parietal posterior. Hemos escogido casos representativos dentro de cada área y a continuación, los superpusimos en el mismo nivel coronal de referencia que les correspondía. Las proyecciones de cada área están representadas en tres filas con los mismos niveles de referencia. El resultado es la **Figura 40**, que nos permite en columnas observar cómo se disponen las proyecciones en el mismo nivel AP y en filas apreciar los cambios, a lo largo del eje AP, de la innervación a la misma región cortical. A menos que se indique lo contrario, vamos a referirnos a los casos representados en dicha figura. La topografía dentro del PulM tiene una disposición tridimensional complicada, probablemente debido a los desplazamientos que ha sufrido el tálamo a lo largo de la evolución y a que las áreas que estamos analizando son relativamente modernas evolutivamente.

En corteza parietal posterior inferior, el patrón de innervación desde pulvinar tiene una gradiente dorso-ventral de forma que las regiones ventrales de esta región (área PFG) reciben aferencias desde PulM rostral y dorsal, en una región que se extiende medio-lateralmente, sin presentarse en niveles caudales del PulM. En cambio, las regiones caudales y dorsales (con afectación de LIP y/o VIP) presentan innervación en niveles rostrales principalmente desde PulA que en niveles posteriores añaden un componente que se extiende dorsoventralmente desde la región central del PulM en niveles AP intermedios del núcleo (**Figura 40 E**).

En corteza prefrontal, observamos dos tipos de patrones de innervación. Por un lado, la innervación dirigida a corteza premotora ventral (podemos observar un patrón similar en el área 45 contigua cf. **Figura 39 A'-E'**), proviene de poblaciones neuronales que se localizan en el tercio proximal del núcleo con una gran extensión anteroposterior, esta innervación parece ser una continuación de la innervación que observamos en DM lateral. Por el contrario, en las regiones asociadas al opérculo frontal; áreas 47L y PrCo, presentan innervación que se origina en poblaciones localizadas en PulA donde forman una banda vertical en su región proximal, en niveles posteriores los grupos de neuronas marcadas se localizan en PulM donde forman una banda diagonal en la región central del núcleo. Esta banda diagonal es característica de estas proyecciones y se encuentra rodeada por los somas que innervan la corteza temporal inferior (**Figura 40 F**). Por último, cabe resaltar que estas proyecciones nunca llegan hasta el polo caudal del pulvinar.



**Figura 40. Resumen de la topografía de las proyecciones desde PulM a regiones de los lóbulos parietal, prefrontal y temporal.**

Representación en casos seleccionados, sobre los cortes de referencia del Atlas de titi común de Paxinos et al. 2012 de las poblaciones de somas marcados tras realizar depósitos de Fast-Blue y CTB-roja en determinadas regiones corticales.

**A-C:** Composición de depósitos ejemplo en cada región cortical, mostrando su extensión en cortes coronales completos y la fotomicrografía del depósito.

**D:** Extensión tangencial de los depósitos en corteza.

**E-G:** progresión rostrocaudal de los mismos niveles coronales de referencia en los que se ha representado los somas marcados de varios casos. En gama de verdes de los somas marcados tras realizar depósitos en corteza parietal posterior (E), los somas marcados en colores rojo y negro tras realizar depósitos en corteza prefrontal ventrolateral (F) y en gama de azules y morado de los depósitos tras realizar depósitos en corteza inferotemporal (G).

Abreviaturas (cf. Lista de abreviaturas), Barras de calibración: A-C 1mm, E-F 2mm.

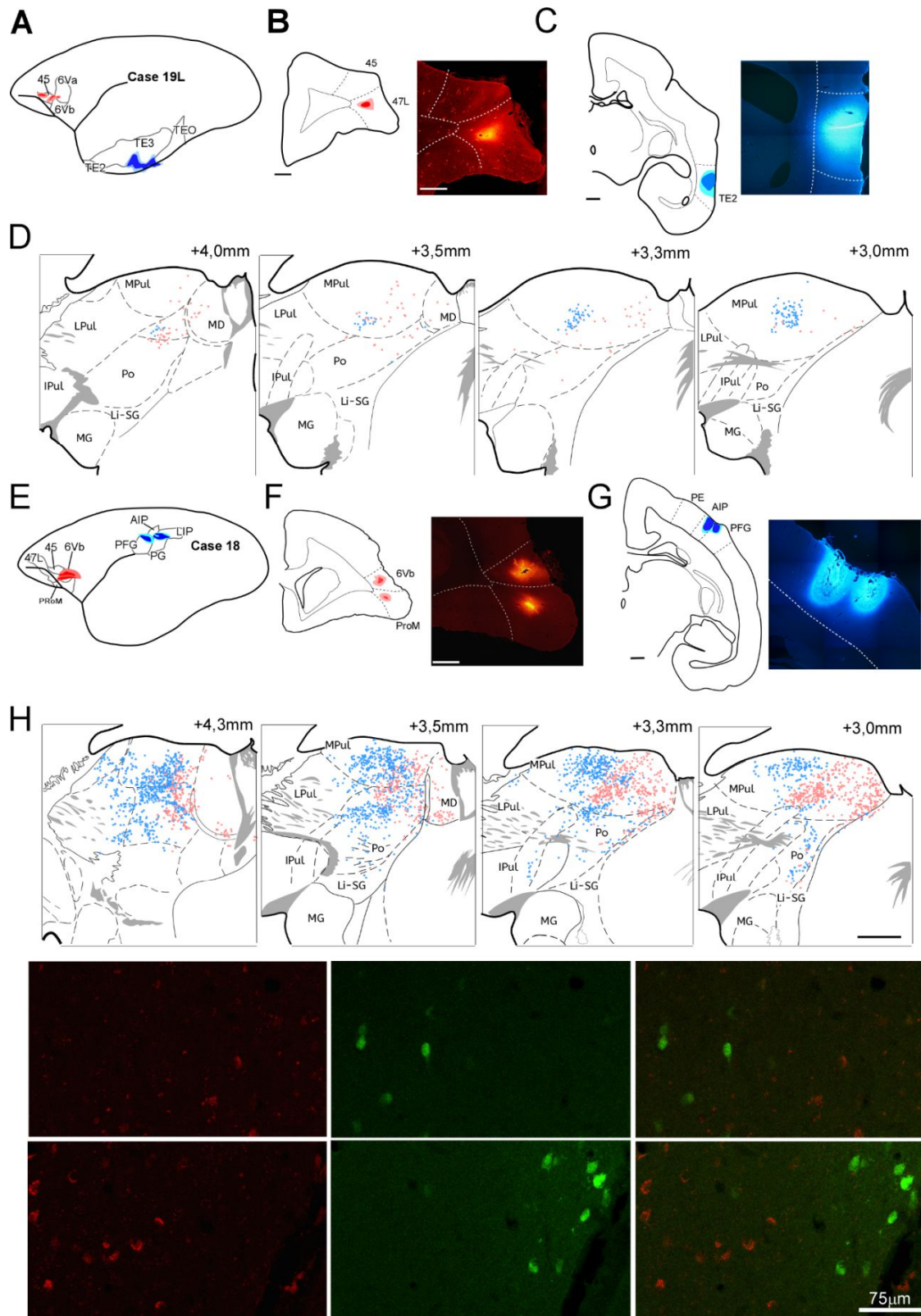
Finalmente, en corteza temporal, tenemos casos válidos únicamente en su región inferior dónde discutiremos la topografía de las proyecciones. Las proyecciones dirigidas a TE3 rostral (caso 29) empiezan en una localización en el tercer tercio lateral en niveles rostrales de PulM, estas proyecciones se desplazan gradualmente a regiones mediales conforme avanzamos posteriormente de modo que en niveles caudales la región medial de PulM presenta proyecciones hacia TE3 rostral. Conforme nos desplazamos caudalmente en el área TE3 (caso 25) observamos que las proyecciones desde PulM se invierten de modo que en niveles rostrales de PulM las proyecciones se encuentran en el primer tercio medial, posteriormente en PulM estas proyecciones se lateralizan progresivamente quedando en el tercio central del núcleo. El caso más caudal en TE3, caso 19 (**Figura 39 A'-E'**), presenta proyecciones que se originan rostralmente en poblaciones de neuronas localizadas en el tercio lateral del núcleo que en el extremo más caudal se observan somas marcados dispersos sin una organización clara.

## 4 EXPERIMENTOS DE DOBLE MARCADO

Gracias al empleo de trazadores retrógrados diferentes en el mismo animal nos fue posible examinar si neuronas del PulM proyectan mediante colaterales regiones corticales de lóbulos diferentes. Esta hipótesis surge de la concurrencia de innervación en regiones de la corteza temporal inferior, parietal posterior y prefrontal ventrolateral tras inyectar BDA en regiones relativamente pequeñas del PulM. Además, en estos casos observamos numerosas ramificaciones axonales en sustancia blanca. De esta forma, nuestro objetivo se enfocó en realizar depósitos en combinación en dichas regiones. Además, el análisis del marcado retrógrado anteriormente descrito, mostró que existen regiones en PulM con neuronas que innervan áreas corticales diferentes, sin estar segregadas en regiones diferentes del núcleo.

En tres casos (15izq, 20izq y 21izq) intentamos obtener zonas de solapamiento de las poblaciones de somas marcados en tálamo tras realizar depósitos en regiones de las cortezas parietal posterior y temporal inferior. Debido a la presencia de contaminación en sustancia blanca nos vimos obligados a dejar fuera del análisis los datos del caso 15izq. El resto de casos produjeron zonas de marcado que no llegaron a ser coincidentes, de forma que los somas marcados desde corteza parietal siempre se quedaron en niveles rostrales a la aparición del marcado desde corteza temporal.





**Figura 41. Análisis de la colocación en PulM de trazadores retrógrados aplicados en diferentes regiones corticales.**

**A-D:** Caso 19izq que presentaba depósitos en cortezas prefrontal y temporal.

**A:** Reconstrucción sobre el hemisferio lateral de la extensión y localización de los depósitos retrógrados corticales. En azul representamos el depósito de Fast-Blue (FB) y en rojo el depósito de la subunidad B de la toxina colérica asociada a una Alexa fluorescente A594 (CTB-rojo).

**B:** Reconstrucción de un nivel coronal que presentaba el centro del depósito de CTB-red en corteza prefrontal, a la derecha se puede observar la fotomicrografía correspondiente.

**C:** ídem B para el depósito de FB, en corteza temporal inferior.

**D:** Localización de las neuronas marcadas en 4 niveles coronales representativos.

**E-I:** Caso 18 en el que se realizó depósitos en regiones de la corteza prefrontal lateral y parietal posterior.

**E-H:** ídem A-D para los depósitos realizados en las cortezas parietal posterior y prefrontal ventrolateral. I: Fotografías realizadas con el microscopio confocal en dos regiones con solapamiento de las poblaciones neuronales marcadas, en el que se observa que los somas se encuentran en regiones próximas, pero no llegan a colocalizar.

Realizamos la combinación de trazadores entre las cortezas prefrontal y temporal en el caso 19izq (para la reconstrucción de los depósitos en corteza con la fotomicrografía de cada uno (cf. **Figura 41** A-C). Observamos a lo largo de los diferentes niveles coronales que la zona de solapamiento de los somas marcados en PulM era muy pequeña lo que nos dificultó encontrar neuronas dobles: la cuidadosa examinación en cada filtro de fluorescencia in situ nos permitió comprobar que no había neuronas doblemente marcadas en este caso (Reconstrucciones de los niveles con los somas marcados desde cada depósito en la **Figura 41** D). Nos encontramos con la problemática de que ambas regiones corticales tienen un patrón de innervación desde PulM opuesto; es decir, las proyecciones hacia parietal se presentan en niveles rostrales del núcleo y las de temporal no llegan a abarcar gran extensión rostral. Ello implica que para localizar dobles tenemos una zona muy restringida del núcleo. Esta parte del análisis requerirá más animales en etapas futuras del proyecto.

Finalmente, obtuvimos cinco casos válidos con depósitos en combinación entre las cortezas prefrontal ventrolateral y parietal posterior (15, 17izq, 17dx, 18 y 26dx). En estos casos encontramos grandes zonas de solapamiento de los somas marcados. Los somas marcados que proyectan hacia prefrontal se localizaban en una banda diagonal en la región central del núcleo, esta región en algunos niveles se encuentra rodeada por la población neuronal que proyecta hacia corteza parietal. En la **Figura 41** representamos los datos de un caso válido con combinación de trazadores en las cortezas parietal posterior (**Figura 41** F) y prefrontal ventrolateral (**Figura 41** G), ambos depósitos presentaron una gran extensión tangencial (**Figura 41** E). Podemos observar en las reconstrucciones en PulM la localización de los somas marcados que presentan la disposición característica mencionada anteriormente (**Figura 41** H superior). Para comprobar que no existían neuronas doblemente marcadas analizamos las regiones de solapamiento con microscopía confocal, donde apreciamos que a pesar de encontrarse a poca distancia en el tálamo ambas poblaciones se mantuvieron separadas (**Figura 41** H inferior).

## **V. DISCUSIÓN**



## 1 Consideraciones metodológicas

### 1.1. Consideraciones sobre las técnicas de trazado de las conexiones pulvino-corticales

#### 1.1.1. Trazado poblacional anterógrado con microdepósitos de BDA 10KDa en PulM

Los datos conectómicos del PulM en primates no humanos de trazado anterógrado de los que disponemos actualmente, provienen en gran parte de trabajos realizados en macacos en los años setenta con depósitos de aminoácidos tritiados (Burton y Jones 1976, Bos y Benvento 1975, Trojanowski y Jacobson 1976, Jones y Burton 1976). Esta técnica a pesar de tener la ventaja de presentar un transporte exclusivamente anterógrado, tiene varios inconvenientes. Primero, presenta dificultades en la interpretación de los resultados, por una parte, el tamaño de la inyección varía considerablemente dependiendo del tiempo de supervivencia y de la técnica de obtención del autoradiograma. Segundo, no se obtiene la arquitectura fina de los axones TC sino que tienen que ser inferidos a partir del patrón de granos de plata sobre las secciones de tejido (Swanson 1981). Por último, es una técnica muy laboriosa que requiere personal entrenado junto con equipamiento especial para el uso de isótopos radioactivos, lo que impide la realización de análisis sistemático en grandes volúmenes de tejido. Además, el tamaño de las inyecciones obtenidas ocupaba una amplia región del núcleo, lo que permite hacer observaciones globales de la conectividad, pero no una topografía más fina.

Por ello, no se realizó ninguna tentativa de división topográfica del PulM hasta el trabajo de Romanski et al. 1997. Utilizando también inyecciones masivas, pero del trazador WGA-HRP, junto con depósitos retrógrados en corteza para delinear a grandes rasgos la composición interna de las proyecciones entre el PulM y la corteza prefrontal. Pese a esto, la delimitación de Romanski no presentan gran resolución anteroposterior ya que los depósitos abarcaban una gran extensión del núcleo y además no realizó reconstrucciones de los plexos marcados de axones en corteza.

En base a las consideraciones previas, podemos afirmar que el análisis anterógrado poblacional del PulM utilizando BDA de alto peso molecular, es necesario para ampliar y refinar el conocimiento conectómico de este interesante núcleo talámico asociativo. El BDA de alto peso molecular 10kDa se utiliza como marcador anterógrado de vías nerviosas (Reiner et al. 2000; Lanciego y Wouterlood 2011), donde produce el marcado de los plexos axonales con gran resolución gracias a la amplificación del ABC. Sin embargo, también tenemos una serie de

limitaciones, la más importante es que el BDA de alto peso molecular no es exclusivamente un trazador anterógrado, presentando también un transporte retrógrado escaso, como se observa en la capa V y VI de algunos plexos de axones marcados con mayor densidad. Los colaterales axónicos de las neuronas marcadas retrógradamente pueden estar marcados, lo que puede hacer difícil saber cuáles de los axones marcados y terminales en una zona cortical son resultado del marcaje anterógrado de las neuronas del sitio de inyección. Sin embargo, se eligieron campos que no contenían ninguna neurona marcada retrógradamente, para realizar la cuantificación estereológica y por tanto tenemos la seguridad de que los parámetros cuantitativos estimados fueron realizados en la población de axones marcados anterógradamente.

Otro aspecto a tener en cuenta es que realizar inyecciones restringidas de trazadores anterógrados en los núcleos posteriores del tálamo de primate es muy complicado. Por una parte, la disponibilidad de primates es limitado y por otro, el tálamo posterior al estar alejado de la línea media tiene gran variabilidad de localización entre los distintos individuos. Hay estudios que enfatizan en primates la imprecisión de las coordenadas estereotáxicas tomadas de forma relativa al meato auditivo, y sugieren usar la marca que hace el hueso esfenoides como una guía visible por radiografía (Aggleton 1985); o usar la resonancia magnética (RM) para localizar la zona en la que se quiere realizar el depósito de trazador (Subramanian et al. 2005), puesto a punto para cirugía del tití común por Mundinano et al. 2016. En nuestro caso, el proyecto de colaboración internacional utilizando titís comunes con la UFRN se encuentra en su fase inicial, por lo que, no se dispone de un servicio de RM para mejorar la precisión de la cirugía estereotáctica. Aún así, el abordaje estereotáxico del PulM presentó una tasa de éxito aceptable siendo la principal causa de fracaso de la cirugía otros aspectos metodológicos (atasco de la pipeta con el trazador, contaminación de otros núcleos talámicos, etc).

#### *1.1.2. Localización de las poblaciones neuronales dentro del PulM que inervan determinadas regiones corticales por medio de trazado retrógrado.*

A pesar de tener una amplia colección de depósitos anterógrados (19 depósitos), queda una amplia región del núcleo sin muestrear, específicamente el sector medial y la región ventral del PulM. Una estrategia para examinar la organización dentro del núcleo, de las poblaciones que inervan regiones específicas corticales, es realizar depósitos de trazadores retrógrados en la corteza cerebral. Sin embargo, como hemos apreciado en el apartado de conectividad y en los resultados del trazado axonal anterógrado, el PulM proyecta a una gran variedad de regiones corticales, de modo que, el estudio de todas las regiones corticales que reciben inervación del PulM no es abarcable.

En consecuencia, decidimos centrarnos en las proyecciones del PulM a la corteza inferotemporal, ventral frontal y parietal posterior, ya que son proyecciones que presentaban consistentemente marcado anterógrado desde depósitos en el sector rostrolateral del PulM. El hecho de que, depósitos de BDA restringidos dentro del PulM, presentaran innervación en estas regiones corticales nos llevó a pensar en la posibilidad de neuronas dentro del PulM que innervaban simultáneamente dos áreas corticales. Escogimos los trazadores retrógrados fluorescentes Fast Blue (FB) y CTb asociadas a alexas fluorescentes. El FB se caracteriza por tener alta sensibilidad de marcado de somas y presenta resistencia moderada a la pérdida de señal en largo plazo (Schofield 2008). La CTB asociada a Alexas fluorescentes, es un trazador con bastante sensibilidad, que permite inyecciones pequeñas y no suele causar lesión citotóxica en el sitio de inyección (Conte et al. 2009). Una gran ventaja es que ambos trazadores no solapan en su espectro de emisión lo que hace posible su uso para experimentos de marcado doble en tálamo.

## 1.2. Análisis cuantitativo

### 1.2.1. Estimación del número de las varicosidades

La necesidad de un acercamiento cuantitativo de la conectividad TC, nos permitirá conocer mejor los parámetros fundamentales de la computación dentro de estos circuitos (Markov y Kennedy 2013). Este apartado de la tesis, tiene como objetivo, poner a punto técnicas para realizar estimaciones cuantitativas de la influencia que ejerce el pulvinar en sus zonas de innervación. Respecto al abordaje estereológico, debido a que es difícil delimitar algunas áreas corticales exclusivamente con técnicas citoarquitectónicas, especialmente las asociativas, para referir los datos a un volumen funcional específico; y al ser una inyección poblacional, no se puede saber el número de neuronas que han captado el trazador.

Por ello, se recurrió a la técnica de estimar parámetros en una zona elegida adrede como la zona de mayor proyección y en esta zona realizar un transecto en el que se formaron 20 BINes del mismo tamaño. En este aspecto, hemos encontrado algunos problemas con el paquete informático, ya que, para que las mediciones fueran correctas, las áreas que se habían delimitado con el programa informático NewCAST no debían moverse al cambiar de objetivo, o al desplazarse en el tejido, para tal fin las lentes eran calibradas antes de iniciar la delimitación de las áreas. A 100X los desplazamientos pasaban desapercibidos, pero al terminar la cuantificación y pasar a aumentos menores, en muchos casos, se observó que el área se había desplazado en algún momento del muestreo y por tanto los datos obtenidos con los disectores no eran válidos.

En cuanto a los análisis estadísticos realizados, al no tener ninguna de las muestras analizadas una distribución normal no se pudo aplicar el análisis de la varianza que sería lo oportuno. Por ello, utilizamos el test de Mann-Whitney para comparar dos a dos las medianas de las poblaciones medias por área y capa que obtuvimos (Fagerland y Sandvik 2009). Además, con el test de Kolmogorov-Smirnov comparamos las distribuciones poblacionales del tamaño de las varicosidades dos a dos.

### *1.2.2. Estimaciones del tamaño de las varicosidades por capa y área*

Se ha demostrado, correlación entre el tamaño de las varicosidades axonales y el número y el tamaño de las sinapsis, y con la eficacia post-sináptica (Pierce y Lewin 1994; Viaene et al. 2011c; Marion et al. 2013). Por ello, realizamos la medición de este parámetro para observar si se apreciaban diferencias de tamaño, entre la capa 1 y las capas intermedias, en los mismos plexos intracorticales en los que se había realizado la estimación estereológica.

Metodológicamente, el aspecto más importante para obtener medidas correctas era ser consistente en la forma de realizar el perfil del área del botón, que todas las mediciones fueran realizadas por la misma persona, y que el contorno de la varicosidad se dibuje en el plano focal en el que el botón se viera con bordes nítidos y con su mayor área de proyección.

## **2 Distribución tangencial y radial en la corteza cerebral de pequeños dominios dentro del núcleo pulvinar medial**

La mayoría de los depósitos obtenidos, tienen aspecto filiforme, lo que puede resultar en un aumento de la dificultad para separar regiones topográficas si estas tienen una organización horizontal dentro del núcleo. Por ello, los trabajos de trazado anterógrado se complementan con los de trazado retrógrado, para conseguir una visión global de los sectores hodológicos que componen el PulM, representados en la **Figura 44**.

### **2.1. Distribución tangencial**

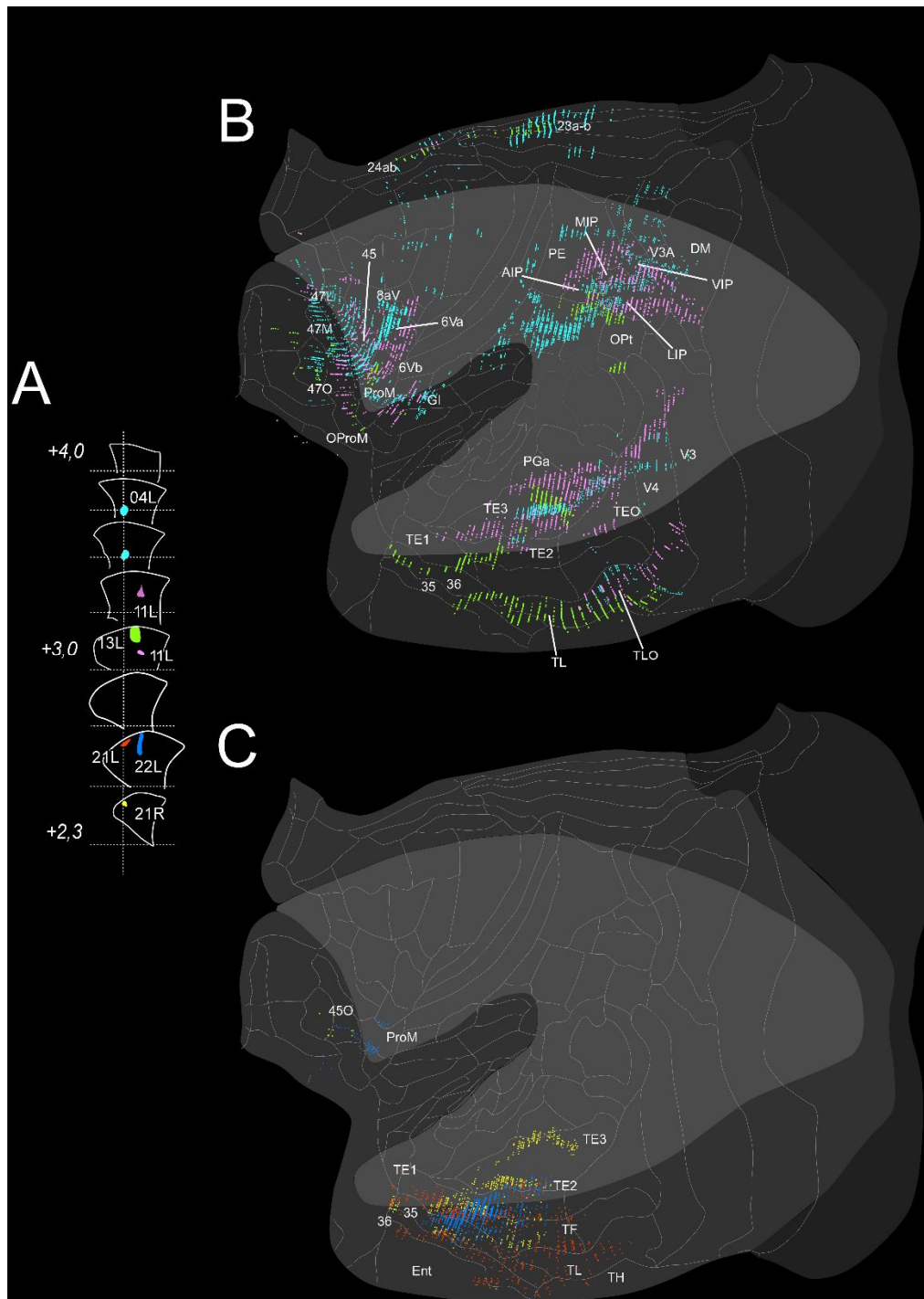
#### *2.1.1. Patrón multilobular*

El patrón multilobular se caracteriza por la presencia de forma consistente en 6 casos con depósitos rostrales en PulM (04izq, 11dx, 11izq, 13izq, 13dx y 12dx) de plexos discretos intracorticales de axones marcados que abarcaban áreas contiguas, en distritos de las cortezas frontal ventral, parietal posterior y temporal inferior. Otros componentes de axones marcados

en las cortezas cingular posterior e insular variaban a lo largo de los casos. Los cambios que se producen a lo largo de la región rostral del PulM (**Figura 42 A** hasta el nivel AP +3.0mm) no son muy acusados; si no que se aprecia un cambio de la combinatoria de intensidad relativa de los componentes (frontal ventral, temporal inferior o parietal posterior) que lo componen (**Figura 42 B**).

Así, en el caso con un depósito más rostral (04izq) apreciamos que los plexos intracorticales de axones marcados en corteza frontal ventral y parietal posterior inferior, presentan mayor intensidad de axones marcados que el plexo localizado en corteza temporal inferior. También, se aprecia la presencia de un componente de axones dispersos en la corteza cingular posterior. En cambio, un depósito localizado caudal y lateralmente (caso 11izq), presenta mayor intensidad de inervación a lo largo de gran parte de la corteza temporal inferior, le sigue otro plexo de axones marcados que se localiza principalmente en las áreas homólogas a las del SIP y en área PE, y en menor cantidad, un plexo de axones marcados en la corteza frontal ventral. Finalmente, un caso con un depósito en una posición dorsal y posterior a los anteriores (13izq), presenta un importante plexo intracortical con una gran extensión anteroposterior en la corteza temporal ventral, los componentes parietal y frontal en cambio se encuentran muy reducidos, y además presenta escasa inervación en corteza cingular posterior.

Al ser la primera vez que se realiza una reconstrucción global de los axones marcados en corteza desde PulM no disponemos de otros trabajos para comparar los cambios de patrón a lo largo del núcleo. Sin embargo, las aferencias generales desde PulM por región cortical pueden ser confirmadas a grandes rasgos por la bibliografía. En el caso de la inervación a corteza frontal ventral, se han descrito proyecciones tras realizar inyecciones centrales en niveles rostrales del PulM (Romanski et al. 1997), en corteza cingular posterior y parahipocampal en un depósito dorsal (Baleydier y Mauguier 1985), tras realizar depósitos de trazadores retrógrados en corteza insular (Jezzini et al. 2015), y en corteza temporal inferior también con depósitos retrógrados (Yeterian y Pandya 1989; Webster et al. 1991; Baleydier y Morel 1992; Steele y Weller 1993).



**Figura 42. Variación del patrón de distribución tangencial de los plexos intracorticales de axones marcados de dos casos rostrales y tres caudales dentro del PulM.**

A: Progresión anteroposterior de los límites del PulM en los que se han representado con codificación de colores los depósitos utilizados en las comparaciones.

B-C: Reconstrucción 2D de la superficie cortical en el que se ha realizado la representación de los axones marcados anterógradamente con BDA. B: Comparación entre un depósito en PulA (rojo, caso 04dx) y un depósito rostral de PulM (azul, caso 04 izq). C: Comparación de dos depósitos de PulM, uno lateral (morado, caso 11izq) y otro dorsal-central (verde, caso 13izq)

### *2.1.1. Patrón restringido al lóbulo temporal*

El patrón de innervación restringida en la corteza temporal inferior y ventral, es característico de las inyecciones localizadas en el tercio caudal del PulM (**Figura 42A**, por delante del nivel AP +3.0mm). Los depósitos más mediales y dorsales (21L y 21R), presentan marcado anterógrado en mayor número de áreas, apreciándose varios parches de innervación que se presentan en varios niveles dorsoventrales. En estos depósitos el que se encuentra más caudalmente proyecta a regiones más dorsales del TE3, en cambio, el caso con depósito rostral innerva mayor superficie de corteza temporal ventral (cortezas perirrinales y parahipocampales). Finalmente, los casos laterales que presentaban gran extensión dorso-lateral (22L y 22R), presentan un parche continuo localizado cerca de la convexidad inferior del lóbulo temporal (**Figura 42C**).

Nuestros resultados concuerdan en la proyección a cortezas parahipocampales (TH, TF), que fueron descritas en el trabajo de Baleyrier y Mauguier 1985, tras realizar depósitos caudales, aunque cabe destacar que los elementos marcados que ellos describen se encuentran en una posición ligeramente más caudal a nuestras proyecciones marcadas, de modo que no describen innervación en cortezas perirrinales. Otro aspecto a tener en cuenta, es que ninguno de nuestros depósitos caudales produce marcado en las regiones análogas a las localizadas en el GTS del macaco, a pesar de que es una proyección observada en varios trabajos (Burton y Jones 1976 y Romanski et al. 1997).

Finalmente, la proyección a regiones inferotemporales no se han descrito en los casos con depósitos anterógrados de la bibliografía, sin embargo, la localización de las poblaciones que innervan estas regiones han sido descritas con depósitos retrógrados en TE1, TE3 y TEO, tanto en nuestros resultados como en la bibliografía (Yeterian y Pandya 1989; Webster et al. 1991; Baleyrier y Morel 1992; Steele y Weller 1993).

### *2.1.2. Patrón cortical de los axones marcados del depósito localizado en la región medial del núcleo pulvinar medial*

El depósito medial presentó innervación en la corteza prefrontal medial; los depósitos retrógrados en estas cortezas realizados en el trabajo de Goldman-Rakic y Porrino 1985 mostraron somas marcadas en la región del PulM donde se localiza el depósito anterógrado. Además, Romanski et al. 1997, con datos de depósitos anterógrados en PulM, describe proyecciones a la corteza prefrontal medial desde lo que considera como la región medial del PulM.

Además de en la corteza prefrontal medial, también se observaron componentes marcados en el polo del lóbulo temporal. Romanski et al. 1997, describe en todos sus depósitos de WGA-HRP en PulM, tanto somas marcados en capas 5 y 6 como terminales marcados en capas intermedias de la corteza en la región temporopolar, presentando mayor intensidad de inervación en el depósito caudal y medial en PulM. Esta proyección también se confirma en estudios con depósitos retrógrados a lo largo de la región temporopolar, que presentaron consistentemente somas marcados en la esquina medial del PulM (Markowitsch et al. 1985; Morán et al. 1987).

### *2.1.3. Patrón restringido a cortezas occipitales*

Los depósitos que se localizaban en PulL (15izq, 14izq, 14dx y 20izq) presentaban un patrón de axones marcados en cortezas occipitales, sin que hubiera en ningún caso elementos marcados en V1. Algunos casos (14izq y 14dx), presentaban implicación de áreas localizadas en la corteza parietal posterior inferior y región caudal de la corteza temporal. Otros depósitos (15izq y 20dx) presentaban un patrón restringido en el lóbulo occipital. A lo largo del eje rostrocaudal, también observamos que el depósito rostral (15izq) presenta un plexo de gran tamaño en la región de la convexidad dorsal del hemisferio, dos plexos de menor densidad se observaron en la corteza parietal posterior y en temporal inferior dorsal. Los casos intermedios (14izq y 20dx), presentan axones marcados formando plexos en una posición más ventral de corteza parietal y en temporal caudal (área TEO), ambos plexos parecen rodear dorsal y ventralmente al área MT. Por último, el caso más ventral de todos presentaba axones marcadas localizados en una posición ventral en las cortezas occipitales V3 y V4 y en la corteza temporal inferior.

La proyección casi exclusiva a corteza inferotemporal posterior y occipital ventral anterior del PulL caudal, se confirma con estudios de trazado anterógrado (Benevento y Rezak 1976b). No se han realizado estudios con depósitos más rostrales que confirmen el patrón que hemos obtenido. No obstante, por medio de trazado retrógrado desde cortezas occipitales, se confirman las proyecciones que hemos obtenido. Por una parte, los somas en el complejo pulvinar que producen inervación a V1 se localizan principalmente en Pull, por lo que, nuestros depósitos no afectaron esta región. Del resto de áreas, en la región medial del PulL (donde se localizan nuestros depósitos) se han descrito proyecciones desde V2, V3, V4 y MTC (Cusick et al. 1993b; Adams et al. 2000; Weller et al. 2002). En el área visual dorsomedial (DM), se han descrito proyecciones con origen en la región lateral del PulL (Norden et al. 1978; Graham et al. 1979; Beck y Kaas 1998), estos datos explican la mayor intensidad de marcaje en el área DM en el caso 15 izq, que presentaba un depósito lateral en Pull.



#### *2.1.4. Depósito en el núcleo pulvinar anterior*

Obtuvimos un depósito de BDA localizado principalmente en PulA, sin embargo, al tener el depósito una estrecha región dorsal que entra en el núcleo LD, no podemos descartar, que el patrón de la distribución tangencial de los axones marcados en corteza presente algo de contaminación desde el LD. Los plexos intracorticales de axones marcados, se localizan formando bandas continuas horizontales dentro de gran parte del lóbulo parietal y de la corteza cingular posterior adyacente. Posteriormente, los plexos de axones marcados se continúan en la región superior de la cara medial del lóbulo occipital y en capa 1 de la región de corteza V1 localizada en el banco superior del surco calcarino.

En la bibliografía no hemos encontrado ningún estudio de trazado anterógrado en PulA. Probablemente se debe a que el PulA no tiene una gran extensión ni anteroposterior ni medio lateral, y, además, se encuentra rodeado por núcleos (DM, PulL y PO) que en caso de contaminación pueden hacer muy difícil la interpretación de los resultados obtenidos. Nuestro depósito se localiza principalmente en PulA, pero tiene algo de contaminación en el núcleo LD que se encuentra dorsal al PulA.

Por ello, debemos confirmar con los datos bibliográficos que las proyecciones que se observan en el depósito no son del LD. Sin embargo, al igual que en PulA la conectividad del núcleo LD de primate tampoco ha sido muy estudiada y lo que se conoce, a partir de estudios de trazado retrógrado en corteza, es que proyecta a la corteza cingular posterior y la región retrosplenial (Baleydier y Mauguier 1980; Vogt et al. 1987) y no se han descrito somas marcadas tras realizar depósitos en corteza parietal posterior lateral (Cappe et al. 2007a) y medial (Leichnetz 2001), ni somatosensorial (Darian-Smith et al. 1990).

En base a lo anterior, podemos concluir que, excepto los plexos intracorticales localizados en la corteza cingular posterior, el resto elementos axónicos marcados pueden considerarse como proyecciones propias del PulA. Así, las proyecciones a corteza somatosensorial han sido ampliamente descritas (Darian-Smith et al. 1990; Krubitzer y Kaas 1990; Grieve et al. 2000). También, se ha confirmado la proyección a la corteza parietal posterior (Cappe et al. 2007a) y por medio de la combinación de registro electrofisiológico con trazado a partir de depósitos retrógrados, se ha descrito que el PulA proyecta principalmente a regiones de la corteza parietal posterior que se activan ante comportamientos de alcance y agarre manual y de defensa (Gharbawie et al. 2010). Por último, la inervación que observamos en corteza premotora también ha sido descrita previamente, aunque es escasa (Morel et al. 2005).

#### *2.1.5. Patrón del caso con un depósito en la región ventral del pulvinar medial*

Sólo tenemos un caso de la región ventral del PulM (caso 12izq), sin embargo, se encuentra muy cerca, al núcleo Li con lo que puede presentar contaminación por este. Por ello, no se puede asegurar si este patrón representa la conectividad de la región ventral del PulM, siendo necesario tomar estos resultados con cautela.

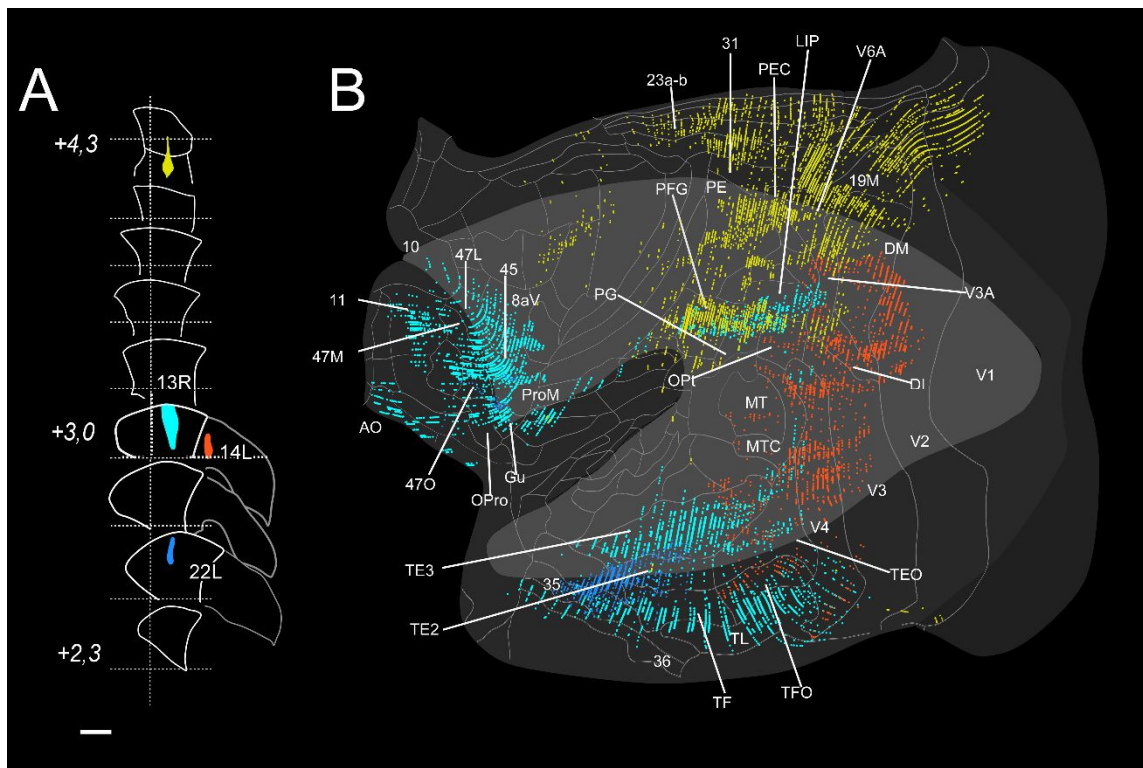
El depósito ventral, presentó invasión en la corteza temporal superior en el área polimodal STP y algo en la región auditiva asociativa parabelt. Es una región que fue evitada sistemáticamente en el resto de depósitos que quedaron en una localización dorsal. En esta región se han realizado depósitos retrógrados que mostraban somas marcadas en la región ventral del PulM (Yeterian y Pandya 1989; Cavada et al. 1995b). En el trabajo de Romanski et al. 1997, también se describe esta proyección con origen en la región medial del PulM. Es más problemático confirmar si los plexos de axones marcados localizados en corteza insular provienen del PulM, ya que, en el trabajo de Burton y Jones 1976 se describe la invasión en corteza insular a partir de un depósito de aminoácidos tritiados en el núcleo Li. Por tanto, la región ventral del PulM requiere de mayor estudio con depósitos restringidos de BDA.

#### *2.1.6. Límites hodológicos del PulM*

Una de las características que más llama la atención en nuestros resultados, es la gran correspondencia neuroquímica y hodológica en la frontera entre PulM y PulL, y la citoarquitectura. Es decir, los cambios en el límite entre ambos núcleos, respecto a la delimitación del atlas de tití común de Paxinos et al. 2012, se realizó originalmente en función de las diferencias en la tinción de AchE. Así, el PulL parece estar caracterizado por mayor intensidad en la tinción de AchE, y el PulM que presenta leve tinción a esta técnica, por este motivo, desviamos el límite entre ambos más medialmente.

Esta delimitación parece confirmarse en nuestros datos de conectividad. Al comparar los patrones dentro del PulM (caso 13izq y 22izq) respecto a un depósito en PulL cerca de la frontera entre PulM/PulL (caso 14izq) (**Figura 43 A**), observamos que el patrón de invasión en corteza en ambos depósitos cambia drásticamente. De esta forma, dentro del PulM, nos encontramos rostralmente, con un patrón de plexos de axones marcados que se distribuyen en distritos específicos de los lóbulos parietal, frontal y temporal, y caudalmente obtenemos un patrón de invasión restringido a la corteza inferotemporal rostral. En contra, el depósito en PulL se localiza principalmente en la cara lateral del lóbulo occipital con una pequeña afectación en áreas caudales de las cortezas parietal inferior y temporal inferior (**Figura 43 B**).

En el depósito localizado en PulA, que constituye el límite rostral del PulM, (**Figura 43 A**) observamos también un brusco cambio en el patrón de inervación cortical respecto a los casos dentro del PulM. De esta forma, el caso con un depósito en PulA (caso 04 izq) presentaba un patrón de inervación cortical que abarcaba gran parte del lóbulo parietal y corteza cingular posterior, además de regiones dorsales de la corteza occipital medial. Es necesario recalcar que, podemos apreciar que la inervación del PulA, parece ser complementaria con la inervación del PulM en el lóbulo parietal. El primero predomina en las regiones superiores de las cortezas parietal superior y el segundo en la región inferior de la corteza parietal posterior (**Figura 43 B**).



### **3 Distribución laminar de los plexos intracorticales y de las varicosidades axonales procedentes de núcleo pulvinar medial en corteza**

#### **3.1. Análisis cualitativo de la distribución laminar de los plexos intracorticales**

Un aspecto muy importante de la conectividad talámica, es la interacción de las proyecciones TC en el circuito cortical; es decir, la distribución de los contactos sinápticos putativos, o varicosidades axonales, a lo largo de las capas corticales. A pesar de que la distribución laminar de los axones TC, ya fue descrita desde Lorente de Nó (1949), y en concreto, en el complejo pulvinar fue descrita en una serie de estudios con aminoácidos trititados en macaco (Jones 1975; Trojanowski y Jacobson 1976a; Baleyrier y Mauguier 1985a). Consideramos importante la obtención de los datos del número de varicosidades, en primate, con técnicas modernas de resolución axonal (BDA) en tres áreas corticales, que reciben importante inervación desde el PulM. En un primer momento, realizamos la reconstrucción de los axones para realizar comparaciones globales de la distribución axonal, en todas las regiones corticales, que presentaban plexos intracorticales de axones marcados anterógradamente. A continuación, eliminamos el efecto que producen los propios axones y nos quedamos exclusivamente con la estimación del número de varicosidades en un transecto, localizado en la región de mayor inervación de los plexos intracorticales que se localizaban en las cortezas parietal posterior, frontal ventral y temporal inferior en tres casos experimentales.

En corteza cingular posterior, apreciamos dos patrones para el depósito en PulA; un patrón localizado en las subdivisiones del área 23, que presentaba dos bandas de mayor inervación, en las capas 1 y 3b, y otro patrón, en la región de la corteza cingular más cercana al cuerpo calloso (área 30) que solo presentaba inervación en capa 1. En corteza parahipocámpal, los depósitos de PulM produjeron un patrón de inervación centrados también en las capas 1, 3b y 4; cabe destacar que el componente en capa 1 presentaba gran desarrollo. Estos datos coinciden con las descripciones realizadas para ambas regiones por Baleyrier y Mauguier 1985b para PulM, excepto la inervación exclusiva a capa 1 observada en el área 30. En regiones de la corteza frontal, Baleyrier y Mauguier 1985b, también observan la misma tendencia (Capas 1, 3b y 4) al igual que nuestros datos. Sin embargo, Trojanowski y Jacobson 1976, sólo describen inervación a las capas intermedias, pero no a capa 1. Finalmente, en corteza parietal posterior y temporal inferior, Jones y Burton 1975, describen sólo el componente de inervación a capas intermedias. Esto entra en contradicción con nuestros datos, que muestran que la distribución de los axones

procedentes del PulM es también a capa 1. Cabe destacar, que desde los depósitos de PulL no se aprecia inervación a capa 1.

De forma general, no observamos inervación en cortezas primarias para los depósitos localizados en PulM y PulL. Una excepción fue el depósito en PulA que inervaba de forma exclusiva en la capa 1 del área V1; en el trabajo de Marion et al. 2013 también obtuvieron el mismo patrón tras inyectar en PulL. Por último, también observamos plexos marcados en la corteza perirrinal que no han sido descritos en la bibliografía, la distribución radial de estos presenta mayor densidad en las capas 3b y 4 y escasos axones a capa 1.

### 3.2. Distribución laminar del número de varicosidades

Son escasos los estudios que realizan estimaciones del número y la distribución radial de las varicosidades axónicas de las proyecciones TC. Una forma, semicuantitativa, para analizar la intensidad de la inervación talámica, en las distintas capas es la medición de la densidad de los granos de plata en corteza a partir de los autorradiogramas obtenidos tras inyectar aminoácidos tritiados en tálamo. En este tipo de estimación, no se están contando las varicosidades como tal sino en conjunto la cantidad de proyección TC que se correlaciona con la densidad de granos de plata; el resultado era el perfil de variación indirecto de la densidad de los plexos intracorticales por capa. Este abordaje fue realizado para las proyecciones desde varios componentes del complejo pulvinar por Trojanowski y Jacobson 1976, y Jones y Burton 1976. Respecto a los máximos de inervación obtenidos en dichos perfiles, para las inyecciones desde PulM, se localizaban exclusivamente en la capa 3b sin involucrar capa 1 tanto en el área TE3 (Jones and Burton 1976) como en el área 45 (Trojanowski y Jacobson 1976). Los perfiles obtenidos con estas técnicas, concuerdan con nuestros datos en la mayor densidad de inervación desde PulM en capa 3b. Sin embargo, a diferencia de esos estudios, obtuvimos de forma consistente, en las tres áreas analizadas un pico de inervación en capa 1, llegando a ser más elevado que el componente a capa 3b en la corteza prefrontal.

Estudios más modernos, con marcado axonal de suficiente resolución para contar las varicosidades axonales, han sido realizados para las proyecciones de GM y Sg en cortezas auditivas e insular de gato (Huang y Winer 2000) y de rata (Smith et al. 2012). Con un abordaje estereológico, se han realizado estimaciones del número de varicosidades en corteza prefrontal, de los terminales marcados tras realizar depósitos en el VA de macaco (Zikopoulos y Barbas 2007a). Los porcentajes obtenidos en dichos trabajos, indican que en los núcleos de relevo (GMv) aproximadamente el 60% de las varicosidades se localiza en la capa 3b, en cambio, los núcleos

secundarios o asociativos (GM dorsal, Sg y VA) presentan un rango entre 30 y 40% de las varicosidades en capa3b y el 10% en capa 1. Nuestros datos en PulM, para las tres áreas corticales analizadas, muestran que el porcentaje en capa 3b estimado en el área temporal inferior es del 50%, en cambio en las cortezas frontal ventral y parietal posterior, se encuentra alrededor del 40%. El porcentaje en capa 1 para la corteza temporal inferior y parietal posterior es del 10%, y en la corteza frontal ventral, el porcentaje dobla su valor (20%). Las tendencias de nuestros datos parecen indicar que el PulM en la corteza temporal inferior presenta un comportamiento parecido al de los núcleos talámicos de relevo como el GMv, en la corteza parietal posterior, apreciamos un comportamiento parecido al de los núcleos secundarios o asociativos (GMd, Sg y VA) y en la corteza frontal, apreciamos un aumento de la influencia de las aferencias talámicas en la capa 1.

### 3.3. Implicación funcional

Como observamos en el apartado de distribución laminar, podemos apreciar que los axones del PulM contactan preferencialmente con los elementos del circuito cortical localizados en capa 1, y principalmente en capas intermedias (3b y 4). Gran parte de la terminación de las proyecciones TC en corteza es en las capas intermedias; con las espinas de las dendritas basales de las neuronas piramidales comisurales de capa 3a e interneuronas (Huand y Winer 2000) y en capa 4 se ha descrito en V1 que los aferentes talámicos sinaptan con neuronas glutamatérgicas espinosas estrelladas e interneuronas (da Costa y Martin 2013). De forma general, cualquier neurona cortical cuya dendrita pase por las capas intermedias (3b y 4) recibirá algunas sinapsis de los terminales TC (revisado en Jones 2007).

Respecto a la capa 1, ha sido una región históricamente poco implicada en el circuito cortical; debido principalmente a que es una capa que no se puede registrar electrofisiológicamente (Petrof y Sherman 2013). Sin embargo, se ha demostrado en rata que gran variedad de núcleos talámicos proyectan a ella masivamente y con una elevada convergencia por lo que presenta una elevada densidad local de terminales talámicas en capa I. Esta capa característicamente contiene los penachos apicales de las neuronas piramidales de las capas 2, 3 y de capa 5 (Rubio-garrido et al. 2009) por lo que se encuentra en una posición estratégica para modular la tasa de disparo de las principales neuronas de la corteza (Palmer et al. 2012). Esta compuesto principalmente por interneuronas inhibitorias que pueden ser de hasta cuatro tipos diferentes, y además, recibe proyecciones TC y CT que llevan información *feedback* que es vital para los procesos cognitivos y atencionales (Larkum 2013). Además, en el caso específico del complejo pulvinar, se ha descrito en galagos que en V1, la inactivación del

PuLL, que proyecta en esta área exclusivamente a capa 1, impide que las neuronas supragranulares respondan a la estimulación visual (Purushothaman et al. 2012).

#### **4 Análisis cuantitativo del tamaño de las varicosidades del núcleo pulvinar medial en corteza**

Algunos estudios han evidenciado que algunas características anatómicas y funcionales están correlacionadas. Así, se ha observado que el tamaño de las varicosidades correlaciona con el número y tamaño de las sinapsis y con la eficacia postsináptica. Por una parte, las vías glutamatérgicas con botones grandes están asociadas a las vías de clase 1 que ejercen un efecto postsináptico “driver”, y por otro, las vías glutamatérgicas asociadas a botones de menor tamaño pertenecen a las vías de clase 2 y ejercen un efecto postsináptico modulador (revisado en Petrof y Sherman 2013). En las vías talamocorticales, el estudio de ambas vías ha sido realizado en A1, S1 y S2 (Viaene et al. 2011a, 2011c) de ratón y en V1 y V2 de posimios (Marion et al 2013).

Por convenio y al igual que en trabajos previos (Zikopoulos y Barbas 2007b, 2012; Viaene et al. 2011a; Marion et al. 2013) se asume que las sinapsis se localizan en las varicosidades, en una proporción uno a uno. White et al. 2004 realizó un análisis de la precisión de esta asunción en las varicosidades que se observaban en terminales talámicos marcados anterógradamente con BDA en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria de rata desde el complejo ventrobasal talámico, dando como resultado que el 87,6% de las sinapsis se forman en las varicosidades y el 67,2% forma una sinapsis por varicosidad. Además, en el trabajo de Smith et al. 2012 analizaron esta cuestión y concluyeron que, los valores de varicosidades observados en el tejido de microscopía óptica, reflejan con razonable exactitud los terminales sinápticos observados en el nivel de la microscopía electrónica. Sin embargo, no hay que perder de vista que en otro estudio se han descrito la existencia de botones TC que no forman contacto sináptico (da Costa y Martin 2011) por lo que la caracterización anatómica debe complementarse con la funcional.

Realizamos el análisis estadístico de las diferencias del tamaño de las varicosidades, medida como el área de máxima proyección, entre capas 1 e intermedias (capas 3b y 4) en los mismos plexos intracorticales analizados en estereología. Sólo hay un trabajo, en microscopía óptica, en el que se miden las varicosidades con un método parecido al nuestro (área de máxima proyección) y en el que comparan el tamaño de las varicosidades entre capa 1 de V1 y V2 y capas intermedias de V2 tras realizar depósitos de dextranos fluorescentes en PuLL del galago (Marion

et al. 2013). En el resto de trabajos realizados en M.O. realizan comparaciones entre capas 4 y capas 2/3 de las cortezas A1, S1 y S2 de ratón tras realizar depósitos en los núcleos talámicos (MG y PO) que inervaban dichas áreas (Germuska et al. 2006; Viaene et al. 2011a; Marion et al. 2013). Nuestros datos en capa 1 de las tres áreas corticales (medias: ParPost=1,34, TempInf=1,45 y frontal ventral=1,33) son cuatro veces mayores respecto a los estimados por Marion et al. 2013 (medias: V1=0,38um<sup>2</sup> y V2=0,33), esto puede deberse a diferencias metodológicas en la obtención de las medidas. Así, en el trabajo de Marion et al. 2013 realizaban el análisis del tamaño de las varicosidades de forma automática, en un “stack” de secciones fluorescentes de microscopía confocal; donde buscaban el plano en el que cada varicosidad presentaba su punto más brillante (plano focal de máxima proyección), filtraban la imagen de la varicosidad a la mitad de la intensidad del punto más brillante y a continuación un programa informático realizaba automáticamente un círculo conteniendo el área de la varicosidad. En cambio, nuestro abordaje utiliza secciones de terminales marcados con BDA en campo claro, con lo que evitamos la pérdida de señal que se produce en la fluorescencia, enfocamos en un objetivo de 100X el campo de varicosidades, para ver con la máxima nitidez posible, y dibujamos manualmente cada una en su área de máxima proyección. No hay ningún estudio previo que haya medido tamaño de botones en las terminales de PulM en las mismas áreas corticales en las que hemos realizado las mediciones de tamaño de varicosidades por lo que no podemos comparar nuestros datos con otros estudios. En el caso de las capas intermedias, las medias de las áreas de mayor proyección para cada área cortical fueron parecidas (TempInf=1,33, ParPost=1,44, Frontal ventral=1,33), también cuatro veces mayores que los resultados de Marion et al. 2013 (V2=0,48).

Para realizar comparaciones respecto a la posible relación del PulM con las vías de clase 1 y 2, son necesarias más mediciones, utilizando nuestra metodología, de los tamaños de varicosidades que provengan de núcleos de talámicos de relevo y por tanto sean de clase 1 (como el GL o VPL). Con nuestros datos podemos afirmar que las varicosidades de capa 1 de la corteza temporal inferior presentan tamaño significativamente mayor respecto a las otras áreas. En contraste, en capas intermedias observamos que son las varicosidades de la corteza parietal posterior las que presentan valores de tamaño mayores. El hecho de si estas varicosidades de mayor tamaño forman parte o no de las vías de clase 1 requiere mayor estudio y caracterización electrofisiológica.



## **5 Análisis de las poblaciones del núcleo pulvinar medial que inervan regiones de las cortezas temporal inferior, parietal posterior y frontal ventrolateral**

Además del análisis, con un abordaje de trazado anterógrado, de la distribución laminar y tangencial en corteza de las poblaciones neuronales dentro del PulM, realizamos un análisis global de la inervación desde PulM que recibían regiones localizadas en las cortezas parietal posterior, temporal inferior y frontal ventral. De forma general, podemos apreciar que la inervación hacia la corteza parietal posterior, se localiza en los niveles rostrales del PulM, las poblaciones neuronales que inervan la corteza frontal ventral se localizan en niveles rostrales en la región medial del núcleo y en caudales conformando una banda estrecha en el centro del núcleo. Finalmente, la inervación hacia la región inferotemporal empieza en niveles AP intermedios para continuarse hasta el extremo más caudal del núcleo donde conforman una población predominante. En la **Figura 40**, se ilustran una serie de casos que resumen la topografía dentro del PulM.

Como podemos apreciar en la bibliografía, la localización de los somas neuronales dentro del PulM que dan lugar a las proyecciones en las regiones corticales analizadas en esta tesis, no se ha analizado de forma sistemática en tití común. En el trabajo de Brysch et al. 1990, se realizaron depósitos en varias regiones corticales, sin embargo, las reconstrucciones que muestra de los somas marcados en PulM no es muy completa. En corteza prefrontal también se realizó un trabajo fragmentario que sólo muestra un nivel coronal del PulM (Roberts et al. 2007), de forma que no es muy concluyente. Además, en corteza inferotemporal no se ha realizado el análisis de sus aferentes subcorticales en tití común y solo disponemos de un trabajo realizado en mono ardilla (Steele y Weller 1993). Por ello, en los siguientes párrafos nos remitiremos generalmente a los estudios realizados en macaco.

Nuestros datos muestran que en corteza parietal posterior el gradiente de inervación, muestra que la porción caudal de esta región cortical está inervada principalmente desde PulA en niveles anteriores, y conforme avanza caudalmente los somas se localizan en PulM. Por el contrario, regiones rostrales de corteza parietal posterior reciben inervación de regiones anteriores del núcleo. Estos datos se confirman con los obtenidos, en macaco, por Schmähmann y Pandya 1990, Kasdon y Jacobson 1978 y Yeterian y Pandya 1989.

La población de neuronas que proyecta hacia la corteza temporal inferior (TE) se localiza hasta los niveles más caudales del núcleo y anteriormente, no se extiende hasta los niveles más

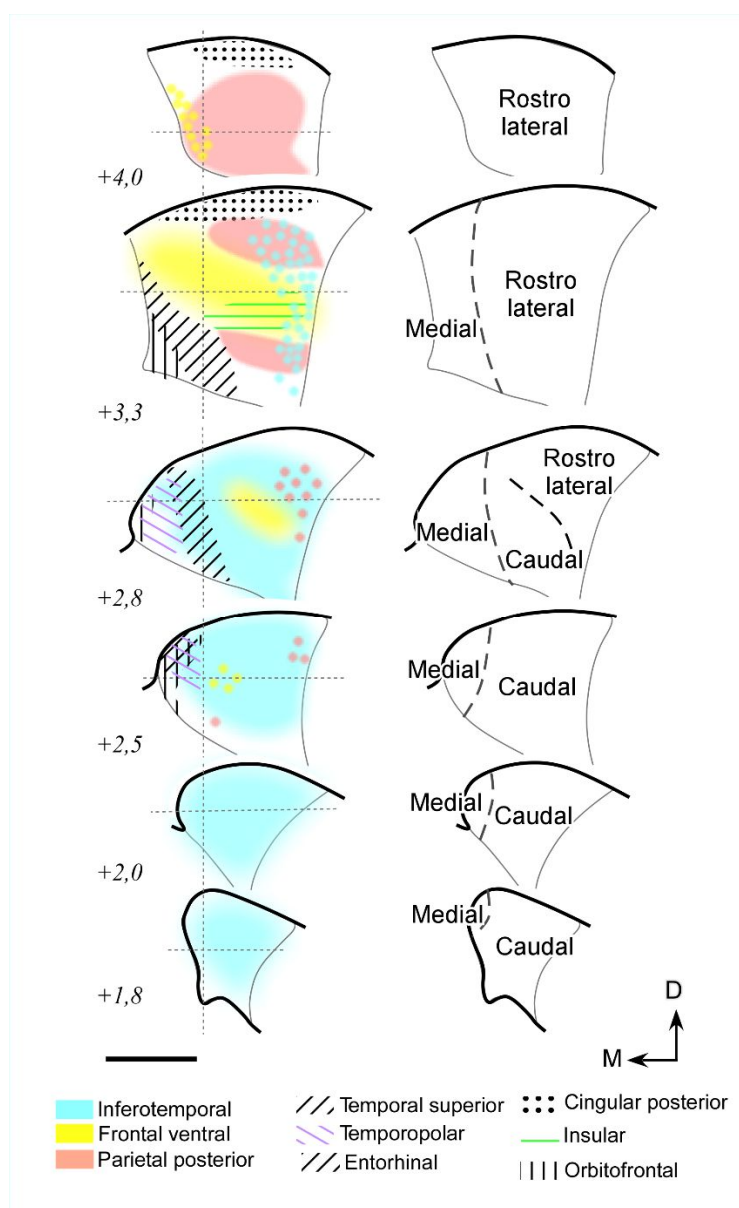
rostrales. Dentro del PulM tenemos un gradiente mediolateral del eje anteroposterior de la corteza TE. En consecuencia, los somas que inervan la corteza TE rostral se localizan en gran parte de la extensión caudal del PulM. En cambio, los somas que inervan la región caudal del TE se localizan en la región lateral y ventral del PulM, principalmente dentro del Pull y PulL. Estos datos confirman los resultados obtenidos en macaco (Baleydier y Morel 1992; Webster et al. 1993) y mono ardilla (Weller y Steele 1992).

Finalmente, las poblaciones neuronales dentro del PulM que inervan la corteza frontal ventrolateral (áreas 47L, 45, 6Vb y ProM) presentan una localización medial en niveles rostrales del PulM y formando una banda horizontal central en niveles caudales del núcleo. En tití común, Roberts et al. 2007 describe únicamente terminales en PulM desde corteza prefrontal ventral y no somas marcados. En cambio, en macaco, se ha confirmado la misma distribución de estos somas en PulM, tras realizar depósitos en corteza prefrontal ventrolateral, áreas 47L, 45 y 6Vb (Asanuma et al. 1985; Goldman-Rakic y Porrino 1985b; Huerta et al. 1986; Romanski et al. 1997). Sin embargo, la organización de los aferentes talámicos del área ProM, ya dentro de la región del opérculo frontal, localizado posteriormente a la corteza prefrontal, no ha sido estudiada anteriormente.

## 6 Sectores hodológicos del núcleo pulvinar medial

El único trabajo en el que se ha realizado una división hodológica del PulM es el de Romanski et al. 1997. Que definieron en base a inyecciones masivas del trazador HRP-WGA dos regiones dentro del PulM; una región lateral y otra central/lateral. La región central/lateral presentaba conexiones con las cortezas prefrontal dorsolateral y orbital, parietal posterior, insular, temporal superior (con mayor intensidad en la región caudal), corteza inferotemporal, cingular posterior y temporopolar. En cambio, la región medial presentaba otro conjunto de conexiones; la innervación hacia las cortezas prefrontal, parietal posterior e insular era más escasas y sus principales eferencias eran con las cortezas temporopolar, temporal superior (principalmente la región rostral), amígdala y cingular anterior.

En la división hodológica que hemos realizado del PulM presentamos dos mejoras conceptuales respecto a la división de Romanski et al. 1997 (**Figura 44**). Por una parte, presentamos la localización aproximada de los sectores dentro del PulM, ya que la mera descripción como central/lateral vs medial nos parece imprecisa. Además, mostramos la progresión anteroposterior de dichos sectores, Romanski et al. 1997 no indicaba de forma fehaciente el nivel anteroposterior de sus subdivisiones del PulM.



**Figura 44.** Sectores hodológicos de las relaciones entre el PulM y distintas regiones de la corteza cerebral.

Progresión anteroposterior de seis niveles del pulvinar, en la esquina inferior izquierda está escrito el nivel del atlas de Paxinos et al. 2012 correspondiente. Barra de calibración 1mm.

**Derecha:** resumen de los resultados de trazado anterógrado y retrógrado analizado en esta tesis. Los colores sólidos representan la topografía inferida a través de nuestros datos experimentales. Las tramas de líneas y círculos representan regiones de supuesta topografía obtenida a partir de los datos de la bibliografía.

**Izquierda:** sectores hodológicos propuestos en PulM.

A partir de los datos bibliográficos y experimentales propios de trazado de las proyecciones pulvinocorticales, hemos realizado una síntesis gráfica de las regiones topográficas de innervación cortical propuestas del PulM. A partir de estas regiones hemos extraído que el PulM podría estar formado por tres sectores cada uno con un patrón hodológico distintivo.

El sector rostrolateral, presenta preponderancia en los niveles rostrales por la innervación hacia la corteza parietal posterior inferior, y en niveles caudales por la innervación hacia la corteza inferotemporal. Entre medias, aparece una población de somas que proyectan a la corteza frontal ventral que se organiza en forma de banda horizontal. Los datos bibliográficos y de trazado anterógrado indican la existencia de una población neuronal que proyecta a la corteza insular. Medialmente, hemos distinguido otro sector: el sector medial, que presenta proyecciones

principalmente a cortezas prefrontal medial y temporopolar. Otras proyecciones sugeridas por la bibliografía son hacia las cortezas temporal superior, entorrinal y orbitofrontal. Finalmente, el sector caudal se caracteriza por presentar preponderancia por la innervación a corteza temporal inferior y ventral.

## 7 Análisis de la divergencia de los axones pulvinocorticales

La presencia de numerosas bifurcaciones axonales en nuestras preparaciones parecía indicar que una misma neurona está divergiendo para innervar al menos dos áreas corticales (cf **Figura 23**). Para demostrarlo sería necesaria la reconstrucción del axón de células individuales o estudios de doble marcado de somas en PulM tras la realización de depósitos en varias áreas corticales con trazadores diferentes.

En macaco, se han descrito neuronas en gran número en pulvinar inferior y lateral que innervan por medio de colaterales regiones con la misma representación retinotópica en V1 y V2. Estas neuronas, que presentan marcado doble tras inyecciones de trazadores retrógrados diferentes en cada área, se encuentran en regiones de solapamiento de las poblaciones y presentan gran sensibilidad topográfica. Es decir, si se realizan depósitos fuera de la representación común no se obtienen regiones solapadas y por ende tampoco neuronas dobles (Kennedy y Bullier 1985). En otros núcleos talámicos de primate también se han descrito neuronas doblemente marcadas, es el caso del VP donde se observaron neuronas que innervaban por colaterales regiones con coincidencia somatotópica (representación de la mano) en las áreas 3b y 2 (Padberg et al. 2009).

Dada la variedad de regiones de proyección a regiones corticales distintas dentro del PulM, esta pregunta, de si una misma célula innerva dos o más regiones corticales por colaterales axónicas, ha sido estudiada por varios autores y en nuestro estudio. Los datos de la bibliografía han sido realizados en macaco, en nuestro estudio tenemos datos realizados en el tití común. Se han encontrado combinaciones de depósitos en corteza que producen solapamiento de marcado en PulM, pero no neuronas dobles.

En la bibliografía encontramos que la inyección simultánea de trazadores retrógrados en áreas relacionadas topográficamente en corteza cingular posterior y parietal posterior se observaron regiones de solapamiento de células marcadas retrógradamente en pulvinar medial lo que quiere decir que estas zonas reciben proyecciones de una zona común del pulvinar medial (Baleydier y Mauguière 1987). El solapamiento también se producía cuando se inyectaba en el

corteza parietal posterior y en la corteza prefrontal lateral (Asanuma et al. 1985). Sin embargo, en ambos estudios no se observa un número elevado de neuronas doblemente marcadas, lo que puede significar que, aunque las proyecciones solapan no provienen de la misma población neuronal si no de dos poblaciones separadas que se encuentran en la misma región de pulvinar.

Nuestro objetivo, era realizar depósitos de trazadores retrógrados en áreas corticales que sabemos, gracias a los experimentos de trazado anterógrado, que reciben innervación de poblaciones celulares que están muy cercanas dentro del PulM. Así, sabíamos que regiones de las cortezas temporal inferior, parietal posterior y prefrontal ventrolateral, recibían innervación de poblaciones celulares que se encontraban muy cercanas en regiones pequeñas dentro del PulM central. Hasta la fecha, hemos explorado exhaustivamente la combinación de depósitos en corteza prefrontal ventrolateral y parietal inferior (cf Apartado 0 de resultados). En los 5 casos se observó que ambas poblaciones estaban segregadas, de modo que, las aferencias a parietal rodeaban a los somas que proyectaban a prefrontal. Sin embargo, en el borde de ambos focos los somas llegaban a estar muy cercanos. Las otras combinaciones desde las cortezas temporal y prefrontal y parietal y temporal necesitan más casos en los que se consiga que las poblaciones se encuentren en posiciones cercanas.

Respecto al abordaje experimental de marcado doble, una de las mayores dificultades es que presenta gran sensibilidad a la topografía de las proyecciones en corteza. Esto ha llevado a que en muchas ocasiones se ha infravalorado las células que están emitiendo colaterales (Schofield et al. 2007). Y el hecho de que las proyecciones del PulM no se encuentren en áreas con topografías fácilmente localizables con abordajes electrofisiológicos lo hace más complicado técnicamente. En consiguiente, la resolución a nivel celular de la integración de la información dentro del PulM requerirá más experimentos de trazado doble o en su defecto la implementación de técnicas de marcado de neurona única en primate.

En línea con lo anterior, sigue siendo una posibilidad que el mecanismo por el que el PulM integra información de distintas modalidades se produzca a nivel poblacional. En el trabajo de Cappe et al. (2009) se analizó la base anatómica de la integración multisensorial y sensoriomotora en tálamo. Tras inyectar en regiones corticales distantes (cortezas auditiva caudal, parietal posterior superior (PE) y premotora) de forma simultánea, describió que en el PulM se produce el mayor solapamiento entre modalidades sensoriales (auditivas y somáticas) y motoras. A nivel poblacional las regiones de solapamiento son lugares indicados para que información de distintas cortezas se integre, por una parte, los axones corticocorticales pueden presentar mayor expansión en PulM, no quedándose restringidos a las comunicaciones

recíprocas, esto permite que a neuronas que inervan un determinado territorio les llegue información de otra región cortical, además si añadimos el factor de solapamiento de los campos dendríticos (Ma et al. 1998b) que aumentaría la comunicación entre áreas de forma transtalámica.

## **7 Implicación funcional**

El pulvinar medial está involucrado en la integración de información cortical asociativa y tiene conexiones con una amplia variedad de áreas corticales (Ma et al. 1998a). Con la corteza de asociación multimodal del lóbulo parietal inferior observamos una importante inervación que en los datos cualitativos de densidad de botones y de longitud de axón es el doble que en otras áreas. Esta parte de la corteza es una región clave donde diferentes modalidades sensoriales interactúan, convirtiéndose en un módulo polimodal en el que se realiza la programación de la acción dirigida a un objetivo con el lóbulo frontal (áreas prefrontales y premotoras). En este contexto el tálamo es un posible candidato al estar localizado en un nodo intermedio que recibe información de muchas fuentes corticales (Cappe et al. 2007b).

El área asociativa de la corteza temporal inferior (TE) se encuentra involucrada principalmente en el procesamiento visual siendo considerada como la etapa final de la corriente ventral del procesamiento visual, que está involucrada en el reconocimiento de la forma y color de los objetos (Zhong 2003) recibe fuertes proyecciones desde el PulL, PulM y PulL (Akbarian et al. 1992). En cuanto al área orbitofrontal, se ha visto que tiene un papel importante en el cambio del comportamiento para hacer frente a alteraciones en el valor de la recompensa de estímulos específicos en el ambiente y la región lateral de la corteza prefrontal en el cambio de los estados atencionales (Roberts et al. 2007).

La conexión recíproca desde pulvinar medial con la ínsula podría jugar un papel importante como base anatómica de la convergencia de las aferencias multisensoriales con la información límbica recogida en la ínsula (Mufson y Mesulam 1984a) de forma que se integra la información somatosensorial y visceral de dolor con numerosas funciones cognitivas (Liang et al. 2013).

La anatomía de estas proyecciones sugieren que las conexiones córtico-pulvino-corticales están involucrados en una gran variedad de funciones incluyendo la atención, memoria de trabajo y el mantenimiento de la importancia de un estímulo (Buchsbaum et al. 2006). Las proyecciones recíprocas que tienen el pulvinar medial permiten que cada célula del pulvinar medial pueda señalar la importancia o no de un estímulo en su propio campo cortical. Las

conexiones pueden ser usadas para pasar la comunicación de un campo cortical a otro siguiendo, no de forma exclusiva, la dirección jerárquica descrita por Van Essen y Sherman (Grieve et al. 2000). El sistema atencional requiere un circuito para decidir cuándo atender y a qué escala espacial, de esta forma los circuitos TC actúan como una compuerta selectiva rápida del flujo de la información cortical (Olshausen et al. 1993). El pulvinar ventral media cambios atencionales involuntarios mientras que el pulvinar dorsal media cambios voluntarios. Esta división de trabajo ofrece la ventaja de la velocidad para el proceso involuntario y la flexibilidad en el proceso voluntario (Van Essen 2005).

## **VI. CONCLUSIONES**



1. Pequeños dominios del núcleo pulvinar medial inervan conjuntos diversos y específicos de áreas corticales, siempre de carácter asociativo complejo. Por ejemplo, la región rostro-lateral del núcleo inerva áreas asociativas de alto nivel de la corteza temporal inferior, parietal posterior inferior y prefrontal ventral y medial. En cambio, la región caudal del PulM inerva sólo áreas temporales inferiores y ventrales.
2. Citoarquitectónicamente, los límites del núcleo pulvinar medial con los núcleos pulvinar lateral y pulvinar anterior son inaparentes; sin embargo, resultan muy abruptos desde el punto de vista hodológico, ya que, a diferencia del núcleo pulvinar medial, los dos últimos núcleos inervan, respectivamente, sólo áreas visuales extrastriadas, o regiones dorsomediales de la corteza parietal posterior y cingular posterior y visual primaria medial.
3. En la mayoría de sus áreas diana, los axones de las neuronas del núcleo pulvinar medial inervan densamente la capa IIIb y la mitad externa de la capa I. Con frecuencia, la extensión tangencial de inervación de la capa I es algo mayor que la de las capas profundas. Los axones del núcleo pulvinar lateral apenas inervan la capa 1. Los axones del núcleo Pulvinar Anterior que inervan V1 se localizan exclusivamente en capa 1.
4. En las cortezas parietal posterior, temporal inferior y frontal ventrolateral, el mayor número de varicosidades axónicas, putativas especializaciones sinápticas, se localiza en la capa IIIb profunda. La mayor densidad de varicosidades se da en las capas 3b y 1.
5. El tamaño de las varicosidades axónicas en la capa 1 y en capas intermedias (3b y 4) es semejante en las áreas y capas analizadas. No obstante, el análisis estadístico sugiere diferencias entre las medianas, siendo mayor esta diferencia entre la capa 1 y capas intermedias de las cortezas temporal y

prefrontal, siendo el tamaño de las varicosidades mayor en la corteza temporal para ambas capas.

6. Las mismas neuronas de proyección del núcleo pulvinar medial no parecen innervar al mismo tiempo, mediante colaterales axónicas, los lóbulos prefrontal, parietal o temporal de la corteza.
7. Sin embargo, la frecuente observación de bifurcaciones en la sustancia blanca subcortical y el patrón multifocal de las arborizaciones terminales dentro de cada una de esos lóbulos sugiere que los axones del núcleo pulvinar arborizan separadamente en varios puntos, dentro de un mismo lóbulo cortical.
8. Las distintas poblaciones de neuronas del núcleo Pulvinar medial que proyectan a diferentes lóbulos corticales se encuentran yuxtapuestas o entremezcladas dentro del PulM, hasta el punto de poder solapar con frecuencia sus campos dendríticos. Ello sugiere la posible existencia de interacciones precisas y selectivas a través del núcleo pulvinar medial entre áreas asociativas corticales distantes.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- Adams MM, Hof PR, Gattass R, Webster MJ, Ungerleider LG. 2000. Visual cortical projections and chemoarchitecture of macaque monkey pulvinar. *J Comp Neurol.* 419:377-393.
- Aggleton JP. 1985. X-ray localization of limbic structures in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J Neurosci Methods.* 14:101-108.
- Akbarian S, Grüsser OJ, Guldin WO. 1992. Thalamic connections of the vestibular cortical fields in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol.* 326:423-441.
- Allman JM, Kaas JH, Lane RH, Miezin FM. 1972. A representation of the visual field in the inferior nucleus of the pulvinar in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Brain Res.* 40:291-302.
- Andersen BB, Gundersen HJG. 1999. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. *J Microsc.* 196:69-73.
- Andersen RA, Snyder LH, Li CS, Stricanne B. 1993. Coordinate transformations in the representation of spatial information. *Curr Opin Neurobiol.* 3:171-176.
- Asanuma C, Andersen RA, Cowan WM. 1985. The thalamic relations of the caudal inferior parietal lobule and the lateral prefrontal cortex in monkeys: Divergent cortical projections from cell clusters in the medial pulvinar nucleus. *J Comp Neurol.* 241:357-381.
- Avendaño C, Stepniewska I, Rausell E, Reinoso-Suárez F. 1990. Segregation and heterogeneity of thalamic cell populations projecting to superficial layers of posterior parietal cortex: a retrograde tracer study in cat and monkey. *Neuroscience.* 39:547-559.
- Bachevalier J, Meunier M, Lu MX, Ungerleider LG. 1997. Thalamic and temporal cortex input to medial prefrontal cortex in rhesus monkeys. *Exp brain Res.* 115:430-444.
- Badre D, D'Esposito M. 2009. Is the rostro-caudal axis of the frontal lobe hierarchical? *Nat Rev Neurosci.* 10:659-669.
- Baizer JS, Desimone R, Ungerleider LG. 1993. Comparison of subcortical connections of inferior temporal and posterior parietal cortex in monkeys. *Vis Neurosci.* 10:59-72.
- Balaram P, Hackett TA, Kaas JH. 2013. Differential expression of vesicular glutamate transporters 1 and 2 may identify distinct modes of glutamatergic transmission in the macaque visual system. *J Chem Neuroanat.* 50-51:21-38.
- Baldauf ZB. 2010. Dual chemoarchitectonic lamination of the visual sector of the thalamic reticular nucleus. *Neuroscience.* 165:801-818.
- Baleydier C, Mauguier F. 1985. Anatomical evidence for medial pulvinar connections with the posterior cingulate cortex, the retrosplenial area, and the posterior parahippocampal gyrus in monkeys. *J Comp Neurol.* 232:219-228.

- Baleydier C, Mauguière F. 1987. Network organization of the connectivity between parietal area 7, posterior cingulate cortex and medial pulvinar nucleus: a double fluorescent tracer study in monkey. *Exp Brain Res.* 66:385-393.
- Baleydier C, Morel A. 1992. Segregated thalamocortical pathways to inferior parietal and inferotemporal cortex in macaque monkey. *Vis Neurosci.* 8:391-405.
- Barbas H, Henion TH, Dermon CR. 1991. Diverse thalamic projections to the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 313:65-94.
- Barbas H, Pandya DN. 1989. Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 286:353-375.
- Batini C, Guegan M, Palestini M, Thomasset M. 1991. The immunocytochemical distribution of calbindin-D28k and parvalbumin in identified neurons of the pulvinar-lateralis posterior complex of the cat. *Neurosci Lett.* 130:203-207.
- Bender DB. 1981. Retinotopic organization of macaque pulvinar. *J Neurophysiol.* 46:672-693.
- Bender DB, Baizer JS. 1990. Saccadic eye movements following kainic acid lesions of the pulvinar in monkeys. *Exp brain Res.* 79:467-478.
- Benevento LA, Rezak M. 1976. The cortical projections of the inferior pulvinar and adjacent lateral pulvinar in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*): an autoradiographic study. *Brain Res.* 108:1-24.
- Benevento LA, Standage GP. 1983. The organization of projections of the retinorecipient and nonretinorecipient nuclei of the pretectal complex and layers of the superior colliculus to the lateral pulvinar and medial pulvinar in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 217:307-336.
- Bermejo PE, Jiménez CE, Torres C V, Avendaño C. 2003. Quantitative stereological evaluation of the gracile and cuneate nuclei and their projection neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 463:419-433.
- Bos J, Benevento LA. 1975. Projections of the medial pulvinar to orbital cortex and frontal eye fields in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Exp Neurol.* 49:487-496.
- Bourne JA, Warner CE, Upton DJ, Rosa MGP. 2007. Chemoarchitecture of the middle temporal visual area in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): Laminar distribution of calcium-binding proteins (calbindin, parvalbumin) and nonphosphorylated neurofilament. *J Comp Neurol.* 500:832-849.
- Boussaoud D, Desimone R, Ungerleider LG. 1991. Visual topography of area TEO in the macaque. *J Comp Neurol.* 306:554-575.
- Boussaoud D, Desimone R, Ungerleider LG. 1992. Subcortical connections of visual areas MST and FST in macaques. *Vis Neurosci.* 9:291-302.
- Bratthauer GL. 2010. The Avidin–Biotin Complex (ABC) Method and Other Avidin–Biotin Binding Methods.

p. 257-270.

- Bridge H, Leopold DA, Bourne JA. 2016. Adaptive Pulvinar Circuitry Supports Visual Cognition. *Trends Cogn Sci.* 20:146-157.
- Brysch W, Brysch I, Creutzfeldt OD, Schlingensiepen R, Schlingensiepen KH. 1990. The topology of the thalamo-cortical projections in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Exp brain Res.* 81:1-17.
- Buchsbaum MS, Buchsbaum BR, Chokron S, Tang C, Wei T-C, Byne W. 2006. Thalamocortical circuits: fMRI assessment of the pulvinar and medial dorsal nucleus in normal volunteers. *Neurosci Lett.* 404:282-287.
- Buckwalter JA, Parvizi J, Morecraft RJ, van Hoesen GW. 2008. Thalamic projections to the posteromedial cortex in the macaque. *J Comp Neurol.* 507:1709-1733.
- Bud Craig AD. 2014. Topographically organized projection to posterior insular cortex from the posterior portion of the ventral medial nucleus in the long-tailed macaque monkey. *J Comp Neurol.* 522:36-63.
- Burman KJ, Palmer SM, Gamberini M, Rosa MGP. 2006. Cytoarchitectonic subdivisions of the dorsolateral frontal cortex of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*), and their projections to dorsal visual areas. *J Comp Neurol.* 495:149-172.
- Burman KJ, Palmer SM, Gamberini M, Spitzer MW, Rosa MGP. 2008. Anatomical and physiological definition of the motor cortex of the marmoset monkey. *J Comp Neurol.* 506:860-876.
- Burton H, Jones EG. 1976. The posterior thalamic region and its cortical projection in new world and old world monkeys. *J Comp Neurol.* 168:249-301.
- Cappe C, Morel A, Barone P, Rouiller EM. 2009. The thalamocortical projection systems in primate: an anatomical support for multisensory and sensorimotor interplay. *Cereb Cortex.* 19:2025-2037.
- Cappe C, Morel A, Rouiller EM. 2007. Thalamocortical and the dual pattern of corticothalamic projections of the posterior parietal cortex in macaque monkeys. *Neuroscience.* 146:1371-1387.
- Casagrande VA. 1994. A third parallel visual pathway to primate area V1. *Trends Neurosci.* 17:305-310.
- Cavada C, Compañy T, Hernández-González A, Reinoso-Suárez F. 1995. Acetylcholinesterase histochemistry in the macaque thalamus reveals territories selectively connected to frontal, parietal and temporal association cortices. *J Chem Neuroanat.* 8:245-257.
- Cerkevich CM, Qi H-X, Kaas JH. 2013. Thalamic input to representations of the teeth, tongue, and face in somatosensory area 3b of macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 521:3954-3971.
- Chamberlin NL, Du B, de Lacalle S, Saper CB. 1998. Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res.* 793:169-175.

- Chow KL. 1950. A retrograde cell degeneration study of the cortical projection field of the pulvinar in the monkey. *J Comp Neurol.* 93:313-340.
- Clascá F, Porrero C, Galazo MJ, Rubio-Garrido P, Evangelio M. 2016. Anatomy and Development of Multispecific Thalamocortical Axons. En: *Axons and Brain Architecture*. Elsevier. p. 69-92.
- Clascá F, Rubio-Garrido P, Jabaudon D, Rubio-garrido JP, Jabaudon D. 2012. Unveiling the diversity of thalamocortical neuron subtypes. *Eur J Neurosci.* 35:1524-1532.
- Cola MG, Seltzer B, Preuss TM, Cusick CG. 2005. Neurochemical organization of chimpanzee inferior pulvinar complex. *J Comp Neurol.* 484:299-312.
- Conley M, Diamond IT. 1990. Organization of the Visual Sector of the Thalamic Reticular Nucleus in Galago. Evidence that the dorsal lateral geniculate and pulvinar nuclei occupy separate parallel tiers. *Eur J Neurosci.* 2:211-226.
- Conley M, Friederich-Ecsy B. 1993. Functional organization of the ventral lateral geniculate complex of the tree shrew (*Tupaia belangeri*): II. Connections with the cortex, thalamus, and brainstem. *J Comp Neurol.* 328:21-42.
- Conte WL, Kamishina H, Reep RL. 2009a. Multiple neuroanatomical tract-tracing using fluorescent Alexa Fluor conjugates of cholera toxin subunit B in rats. *Nat Protoc.* 4:1157-1166.
- Conte WL, Kamishina H, Reep RL. 2009b. The efficacy of the fluorescent conjugates of cholera toxin subunit B for multiple retrograde tract tracing in the central nervous system. *Brain Struct Funct.* 213:367-373.
- Covic EN, Sherman SM. 2011. Synaptic properties of connections between the primary and secondary auditory cortices in mice. *Cereb Cortex.* 21:2425-2441.
- Crouch RL. 1934. The nuclear configuration of the thalamus of *Macacus rhesus*. *J Comp Neurol.* 59:451-485.
- Cusick CG, Scriptor JL, Darensbourg JG, Weber JT. 1993. Chemoarchitectonic subdivisions of the visual pulvinar in monkeys and their connectional relations with the middle temporal and rostral dorsolateral visual areas, MT and DLr. *J Comp Neurol.* 336:1-30.
- Darian-Smith C, Darian-Smith I, Cheema SS. 1990. Thalamic projections to sensorimotor cortex in the macaque monkey: Use of multiple retrograde fluorescent tracers. *J Comp Neurol.* 299:17-46.
- de la Mothe LA, Blumell S, Kajikawa Y, Hackett TA. 2006. Thalamic connections of the auditory cortex in marmoset monkeys: core and medial belt regions. *J Comp Neurol.* 496:72-96.
- de la Mothe LA, Blumell S, Kajikawa Y, Hackett TA. 2012. Thalamic connections of auditory cortex in marmoset monkeys: lateral belt and parabelt regions. *Anat Rec (Hoboken).* 295:822-836.

- Dejerine J, Dejerine-Klumpe A. 1901. Anatomie des Centres Nerveux. Paris.
- Demeulemeester H, Arckens L, Vandesande F, Orban GA, Heizmann CW, Pochet R. 1991. Calcium binding proteins as molecular markers for cat geniculate neurons. *Exp brain Res.* 83:513-520.
- Dempsey EW, Morison RS. 1941. The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation. *Am J Physiol -- Leg Content.* 135.
- Deschênes M, Bourassa J, Parent A. 1996. Striatal and cortical projections of single neurons from the central lateral thalamic nucleus in the rat. *Neuroscience.* 72:679-687.
- Dick A, Kaske A, Creutzfeldt OD. 1991. Topographical and topological organization of the thalamocortical projection to the striate and prestriate cortex in the marmoset (*Callithrix jacchus*). *Exp Brain Res.* 84:233-253.
- Dobrunz LE, Stevens CF. 1997. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron.* 18:995-1008.
- Fagerland MW, Sandvik L. 2009. The Wilcoxon-Mann-Whitney test under scrutiny. *Stat Med.* 28:1487-1497.
- Felleman DJ, Van Essen DC. 1991. Distributed Hierarchical Processing in the Primate Cerebral Cortex. *Cereb Cortex.* 1:1-47.
- Ferster D, Levy S. 1978. The axonal arborizations of lateral geniculate neurons in the striate cortex of the cat. *J Comp Neurol.* 182:923-944.
- Foley P. 2015. Neuroanatomical Terminology: A Lexicon of Classical Origins and Historical Foundations by Larry W. Swanson. *J Hist Neurosci.* 24:106-108.
- Freund TF, Martin KAC, Whitteridge D. 1985. Innervation of cat visual areas 17 and 18 by physiologically identified X- and Y- type thalamic afferents. I. Arborization patterns and quantitative distribution of postsynaptic elements. *J Comp Neurol.* 242:263-274.
- Friedemann M. 1911. Die Cytoarchitektonik des Zwischenhirns der Cercopitheken mit besonderer Berücksichtigung des Thalamus opticus. *J f Psychol u Neurol.* 18:309.
- Gamberini M, Bakola S, Passarelli L, Burman KJ, Rosa MGP, Fattori P, Galletti C. 2015. Thalamic projections to visual and visuomotor areas (V6 and V6A) in the Rostral Bank of the parieto-occipital sulcus of the Macaque. *Brain Struct Funct.*
- García-Cabezas MA, Rico B, Sánchez-González MA, Cavada C. 2007. Distribution of the dopamine innervation in the macaque and human thalamus. *Neuroimage.* 34:965-984.
- Gattass R, Oswaldo-Cruz E, Sousa AP. 1978. Visuotopic organization of the cebus pulvinar: a double representation the contralateral hemifield. *Brain Res.* 152:1-16.



- Geneser-Jensen FA, Blackstad TW. 1971. Distribution of acetyl cholinesterase in the hippocampal region of the guinea pig. I. Entorhinal area, parasubiculum, and presubiculum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 114:460-481.
- Germuska M, Saha S, Fiala J, Barbas H. 2006. Synaptic distinction of laminar-specific prefrontal-temporal pathways in primates. *Cereb Cortex.* 16:865-875.
- Gharbawie OA, Stepniewska I, Burish MJ, Kaas JH. 2010. Thalamocortical connections of functional zones in posterior parietal cortex and frontal cortex motor regions in New World monkeys. *Cereb Cortex.* 20:2391-2410.
- Giguere M, Goldman-Rakic PS. 1988. Mediodorsal nucleus: Areal, laminar, and tangential distribution of afferents and efferents in the frontal lobe of rhesus monkeys. *J Comp Neurol.* 277:195-213.
- Goldman-Rakic PS, Porrino LJ. 1985. The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. *J Comp Neurol.* 242:535-560.
- Gray D, Gutierrez C, Cusick CG. 1999. Neurochemical organization of inferior pulvinar complex in squirrel monkeys and macaques revealed by acetylcholinesterase histochemistry, calbindin and Cat-301 immunostaining, and Wisteria floribunda agglutinin binding. *J Comp Neurol.* 409:452-468.
- Grieve KL, Acuna C, Cudeiro J. 2000. The primate pulvinar nuclei: vision and action. *Trends Neurosci.* 23:35-39.
- Guillery RW, Sherman SM. 2002. Thalamic relay functions and their role in corticocortical communication: generalizations from the visual system. *Neuron.* 33:163-175.
- Gundersen HJG, Jensen EB, Kiêu K, Nielsen J. 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J Microsc.* 193:199-211.
- Gutierrez C, Cola MG, Seltzer B, Cusick C. 2000. Neurochemical and connectional organization of the dorsal pulvinar complex in monkeys. *J Comp Neurol.* 419:61-86.
- Gutierrez C, Yaun A, Cusick CG. 1995. Neurochemical subdivisions of the inferior pulvinar in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 363:545-562.
- Hackett TA, De La Mothe LA, Ulbert I, Karmos G, Smiley J, Schroeder CE. 2007. Multisensory convergence in auditory cortex, II. Thalamocortical connections of the caudal superior temporal plane. *J Comp Neurol.* 502:924-952.
- Hackett TA, Stepniewska I, Kaas JH. 1998. Thalamocortical connections of the parabelt auditory cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 400:271-286.
- Hardy SG, Lynch JC. 1991. The spatial distribution of pulvinar neurons that project to two subregions of the inferior parietal lobule in the macaque. *Cereb cortex.* 2:217-230.

- Hashikawa T, Molinari M, Rausell E, Jones EG. 1995. Patchy and laminar terminations of medial geniculate axons in monkey auditory cortex. *J Comp Neurol.* 362:195-208.
- Hashikawa T, Rausell E, Molinari M, Jones EG. 1991. Parvalbumin- and calbindin-containing neurons in the monkey medial geniculate complex: differential distribution and cortical layer specific projections. *Brain Res.* 544:335-341.
- Hendry SH, Yoshioka T. 1994. A neurochemically distinct third channel in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *Science.* 264:575-577.
- Herkenham M. 1980. Laminar Organization. *Science* (80- ). 207:532-535.
- Hsu DT, Price JL. 2007. Midline and intralaminar thalamic connections with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 504:89-111.
- Huang CL, Winer JA. 2000. Auditory thalamocortical projections in the cat: laminar and areal patterns of input. *J Comp Neurol.* 427:302-331.
- Huerta MF, Krubitzer LA, Kaas JH. 1987. Frontal eye field as defined by intracortical microstimulation in squirrel monkeys, owl monkeys, and macaque monkeys II. cortical connections. *J Comp Neurol.* 265:332-361.
- Huffman KJ, Krubitzer LA. 2001. Thalamo-cortical connections of areas 3a and M1 in marmoset monkeys. *J Comp Neurol.* 435:291-310.
- Imura K, Rockland KS. 2007. Giant neurons in the macaque pulvinar: a distinct relay subpopulation. *Front Neuroanat.* 1:2.
- Insausti R, Amaral DG, Cowan WM. 1987. The entorhinal cortex of the monkey: III. Subcortical afferents. *J Comp Neurol.* 264:396-408.
- Isbell LA. 2009. *The Fruit, The Tree, and The Serpent.* Harvard University Press.
- Itaya SK, Van Hoesen GW. 1983. Retinal projections to the inferior and medial pulvinar nuclei in the Old-World monkey. *Brain Res.* 269:223-230.
- Jasper H. 1949. Diffuse projection systems: The integrative action of the thalamic reticular system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1:405-420.
- Jasper H. 1954. Functional properties of the thalamic reticular system.
- Jensen KF, Killackey HP. 1987. Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. I. The normal morphology of specific thalamocortical afferents. *J Neurosci.* 7:3529-3543.
- Jezzini A, Rozzi S, Borra E, Gallese V, Caruana F, Gerbella M. 2015. A shared neural network for emotional expression and perception: an anatomical study in the macaque monkey. *Front Behav Neurosci.*

9:243.

Jones E. G. 1998a. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience*. 85:331-345.

Jones EG. 1998b. A new view of specific and nonspecific thalamocortical connections. *Adv Neurol*. 77:49-71-3.

Jones EG. 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci*. 24:595-601.

Jones EG. 2012. History of Neuroscience: The Thalamus. *IBRO Hist Neurosci*.

Jones EG, Burton H. 1976. Areal differences in the laminar distribution of thalamic afferents in cortical fields of the insular, parietal and temporal regions of primates. *J Comp Neurol*. 168:197-247.

Jones EG, Hendry SHC. 1989. Differential Calcium Binding Protein Immunoreactivity Distinguishes Classes of Relay Neurons in Monkey Thalamic Nuclei. *Eur J Neurosci*. 1:222-246.

Kaas JH, Collins CE. 2003. The Primate Visual System, *Frontiers in Neuroscience*. Taylor y Francis.

Kaas JH, Lyon DC. 2007. Pulvinar contributions to the dorsal and ventral streams of visual processing in primates. *Brain Res Rev*. 55:285-296.

Kasdon DL, Jacobson S. 1978. The thalamic afferents to the inferior parietal lobule of the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 177:685-706.

Kaske A, Dick A, Creutzfeldt OD. 1991. The local domain for divergence of subcortical afferents to the striate and extrastriate visual cortex in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a multiple labelling study. *Exp Brain Res*. 84:254-265.

Kastner S, Pinsk MA. 2004. Visual attention as a multilevel selection process. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 4:483-500.

Kennedy H, Bullier J. 1985. A double-labeling investigation of the afferent connectivity to cortical areas V1 and V2 of the macaque monkey. *J Neurosci*. 5:2815-2830.

Krubitzer LA, Kaas JH. 1990. The organization and connections of somatosensory cortex in marmosets. *J Neurosci*. 10:952-974.

Krzywinski M, Altman N. 2014. Points of Significance: Visualizing samples with box plots. *Nat Methods*. 11:119-120.

Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y. 2007. Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *J Neurosci*. 27:1139-1150.

Kultas-Ilinsky K, Sivan-loukianova E, Ilinsky IA. 2003. Reevaluation of the primary motor cortex connections with the thalamus in primates. *J Comp Neurol*. 457:133-158.

- Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hioki H, Kaneko T. 2009. Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: a single neuron-tracing study using viral vectors. *Cereb Cortex*. 19:2065-2077.
- Kuramoto E, Ohno S, Furuta T, Unzai T, Tanaka YR, Hioki H, Kaneko T. 2015. Ventral Medial Nucleus Neurons Send Thalamocortical Afferents More Widely and More Preferentially to Layer 1 than Neurons of the Ventral Anterior-Ventral Lateral Nuclear Complex in the Rat. *Cereb Cortex*. 25:221-235.
- Lakatos P, O'Connell MN, Barczak A. 2016. Pondering the Pulvinar. *Neuron*. 89:5-7.
- Lanciego JL, Wouterlood FG. 2011. A half century of experimental neuroanatomical tracing. *J Chem Neuroanat*. 42:157-183.
- Larkum ME. 2013. The yin and yang of cortical layer 1. *Nat Neurosci*. 16:114-115.
- Lee CC, Sherman SM. 2008. Synaptic properties of thalamic and intracortical inputs to layer 4 of the first- and higher-order cortical areas in the auditory and somatosensory systems. *J Neurophysiol*. 100:317-326.
- Leichnetz GR. 2001. Connections of the medial posterior parietal cortex (area 7m) in the monkey. *Anat Rec*. 263:215-236.
- Levitt JB, Yoshioka T, Lund JS. 1995. Connections between the pulvinar complex and cytochrome oxidase-defined compartments in visual area V2 of macaque monkey. *Exp brain Res*. 104:419-430.
- Liang M, Mouraux A, Iannetti GD. 2013. Bypassing primary sensory cortices--a direct thalamocortical pathway for transmitting salient sensory information. *Cereb Cortex*. 23:1-11.
- Lin C-S, Kaas JH. 1979. The inferior pulvinar complex in owl monkeys: Architectonic subdivisions and patterns of input from the superior colliculus and subdivisions of visual cortex. *J Comp Neurol*. 187:655-678.
- Locke S. 1960. The projection of the medial pulvinar of the macaque. *J Comp Neurol*. 115:155-169.
- Lorente de No R. 1938. Architectonics and the Structure of the Cerebral Cortex. En: Fulton JF, editor. *Physiology of the Nervous System*. Oxford University Press. p. 291-330.
- Luys J. 1865. *Recherches sur le système nerveux cérébro-spinal*. Paris: H. Bailliere.
- Lysakowski A, Standage GP, Benevento LA. 1986. Histochemical and architectonic differentiation of zones of pretectal and collicular inputs to the pulvinar and dorsal lateral geniculate nuclei in the macaque. *J Comp Neurol*. 250:431-448.
- Ma TP, Lynch JC, Donahoe DK, Attallah H, Rafols J. 1998. Organization of the medial pulvinar nucleus in the macaque. *Anat Rec*. 250:220-237.

- Macchi G, Bentivoglio M, Minciacchi D, Molinari M. 1996. Trends in the anatomical organization and functional significance of the mammalian thalamus. *Ital J Neurol Sci.* 17:105-129.
- Mai J, Paxinos G. 2011. *The human Nervous System*. 3rd ed. Academic Press.
- Marion RT, Li K, Purushothaman G, Jiang Y, Casagrande VA. 2013. Morphological and neurochemical comparisons between pulvinar and V1 projections to V2. *J Comp Neurol.* 521:813-832.
- Markov NT, Ercsey-Ravasz MM, Ribeiro Gomes AR, Lamy C, Magrou L, Vezoli J, Misery P, Falchier A, Quilodran R, Gariel MA, Sallet J, Gamanut R, Huissoud C, Clavagnier S, Giroud P, Sappey-Marinier D, Barone P, Dehay C, Toroczkai Z, Knoblauch K, Van Essen DC, Kennedy H. 2014. A Weighted and Directed Interareal Connectivity Matrix for Macaque Cerebral Cortex. *Cereb Cortex.* 24:17-36.
- Markov NT, Kennedy H. 2013. The importance of being hierarchical. *Curr Opin Neurobiol.* 23:187-194.
- Markowitsch HJ, Emmans D, Irle E, Streicher M, Preilowski B. 1985. Cortical and Subcortical Afferent Connections of the Primates Temporal Pole - a Study of Rhesus-Monkeys, Squirrel-Monkeys, and Marmosets. *J Comp Neurol.* 242:425-458.
- McAlonan K, Cavanaugh J, Wurtz RH. 2008. Guarding the gateway to cortex with attention in visual thalamus. *Nature.* 456:391-394.
- Mesulam M-M, Pandya DN. 1973. The projections of the medial geniculate complex within the sylvian fissure of the rhesus monkey. *Brain Res.* 60:315-333.
- Mitchell AS. 2015. The mediodorsal thalamus as a higher order thalamic relay nucleus important for learning and decision-making. *Neurosci Biobehav Rev.* 54:76-88.
- Mitchell AS, Chakraborty S. 2013. What does the mediodorsal thalamus do? *Front Syst Neurosci.* 7:37.
- Molinari M, Leggio MG, Dell'Anna ME, Giannetti S, Macchi G. 1994. Chemical Compartmentation and Relationships between Calcium-binding Protein Immunoreactivity and Layer-specific Cortical and Caudate-projecting Cells in the Anterior Intralaminar Nuclei of the Cat. *Eur J Neurosci.* 6:299-312.
- Morán M a, Mufson EJ, Mesulam MM. 1987. Neural inputs into the temporopolar cortex of the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 256:88-103.
- Morecraft RJ, Geula C, Mesulam M-M. 1993. Architecture of Connectivity Within a Cingulo-Fronto-Parietal Neurocognitive Network for Directed Attention. *Arch Neurol.* 50:279-284.
- Morel A, Liu J, Wannier T, Jeanmonod D, Rouiller EM. 2005. Divergence and convergence of thalamocortical projections to premotor and supplementary motor cortex: a multiple tracing study in the macaque monkey. *Eur J Neurosci.* 21:1007-1029.
- Morison RS, Dempsey EW. 1941. A study of thalamo-cortical relations. *Am J Physiol -- Leg Content.* 135.

- Morrison JH, Foote SL. 1986. Noradrenergic and serotonergic innervation of cortical, thalamic, and tectal visual structures in Old and New World monkeys. *J Comp Neurol.* 243:117-138.
- Mufson EJ, Mesulam M-M. 1984. Thalamic connections of the insula in the rhesus monkey and comments on the paralimbic connectivity of the medial pulvinar nucleus. *J Comp Neurol.* 227:109-120.
- Nakagawa S, Tanaka S. 1984. Retinal projections to the pulvinar nucleus of the macaque monkey: a re-investigation using autoradiography. *Exp brain Res.* 57:151-157.
- Nakamura H, Hioki H, Furuta T, Kaneko T. 2015. Different cortical projections from three subdivisions of the rat lateral posterior thalamic nucleus: a single-neuron tracing study with viral vectors. *Eur J Neurosci.* 41:1294-1310.
- Nakano K, Tokushige A, Kohno M, Hasegawa Y, Kayahara T, Sasaki K. 1992. An autoradiographic study of cortical projections from motor thalamic nuclei in the macaque monkey. *Neurosci Res.* 13:119-137.
- Niewenhuys R, Donkelaar H, Nicholson C (Eds.). 1998. *The Central Nervous System of Vertebrates.* ilustrada. ed. Springer US.
- Nosedá R, Jakubowski M, Kainz V, Borsook D, Burstein R. 2011. Cortical Projections of Functionally Identified Thalamic Trigeminovascular Neurons: Implications for Migraine Headache and Its Associated Symptoms. *J Neurosci.* 31:14204-14217.
- Nuzzo RL. 2016. The Box Plots Alternative for Visualizing Quantitative Data. *PMyR.* 8:268-272.
- O'Brien BJ, Abel PL, Olavarria JF. 2001. The retinal input to calbindin-D28k-defined subdivisions in macaque inferior pulvinar. *Neurosci Lett.* 312:145-148.
- Oberlaender M, Ramirez A, Bruno RM. 2012. Sensory experience restructures thalamocortical axons during adulthood. *Neuron.* 74:648-655.
- Odagiri S, Meguro R, Asano Y, Tani T, Ichinohe N. 2011. Single Axon Branching Analysis in Rat Thalamocortical Projection from the Anteroventral Thalamus to the Granular Retrosplenial Cortex. *Front Neuroanat.* 5:63.
- Ogren MP, Hendrickson AE. 1979a. The structural organization of the inferior and lateral subdivision of the Macaca monkey pulvinar. *J Comp Neurol.* 188:147-178.
- Ogren MP, Hendrickson AE. 1979b. The morphology and distribution of striate cortex terminals in the inferior and lateral subdivisions of the Macaca monkey pulvinar. *J Comp Neurol.* 188:179-199.
- Ohman A, Soares JJ. 1993. On the automatic nature of phobic fear: conditioned electrodermal responses to masked fear-relevant stimuli. *J Abnorm Psychol.* 102:121-132.
- Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. 2012. A morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: a

- single neuron tracing study with viral vectors. *Cereb Cortex*. 22:2840-2857.
- Ojima H. 1994. Terminal morphology and distribution of corticothalamic fibers originating from layers 5 and 6 of cat primary auditory cortex. *Cereb Cortex*. 4:646-663.
- Olshausen B, Anderson C, Van Essen DC. 1993. A neurobiological model of visual attention and invariant pattern recognition based on dynamic routing of information. *J Neurosci*. 13:4700-4719.
- Olszewski J. 1952. *The Thalamus of Macaca Mulatta. An atlas for use with the Stereotaxic Instrument.* Montreal,. ed. Karger.
- Orban GA, Zhu Q, Vanduffel W. 2014. The transition in the ventral stream from feature to real-world entity representations. *Front Psychol*. 5:1-9.
- Padberg J, Cerkevich CM, Engle J, Rajan AT, Recanzone G, Kaas JH, Krubitzer LA. 2009. Thalamocortical connections of parietal somatosensory cortical fields in macaque monkeys are highly divergent and convergent. *Cereb Cortex*. 19:2038-2064.
- Padmala S, Lim S-L, Pessoa L. 2010. Pulvinar and Affective Significance: Responses Track Moment-to-Moment Stimulus Visibility. *Front Hum Neurosci*. 4:1-9.
- Palmer L, Murayama M, Larkum ME. 2012. Inhibitory Regulation of Dendritic Activity in vivo. *Front Neural Circuits*. 6:26.
- Pandya D, Rosene DL. 1993. Laminar Termination Patterns of Thalamic, Callosal, and Association Afferents in the Primary Auditory Area of the Rhesus Monkey. *Exp Neurol*. 119:220-234.
- Parent M, Parent A. 2005. Single-axon tracing and three-dimensional reconstruction of centre median-parafascicular thalamic neurons in primates. *J Comp Neurol*. 481:127-144.
- Paxinos G, Watson C, Petrides M, Rosa MGP, Tokuno H. 2012. *The Marmoset Brain in Stereotaxic Coordinates.* 1st ed. Elsevier.
- Petersen SE, Robinson DL, Keys W. 1985. Pulvinar nuclei of the behaving rhesus monkey: visual responses and their modulation. *J Neurophysiol*. 54:867-886.
- Petrides M, Pandya DN. 2002. Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque ventrolateral prefrontal cortex and corticocortical connection patterns in the monkey. *Eur J Neurosci*. 16:291-310.
- Petrof I, Sherman SM. 2013. Functional significance of synaptic terminal size in glutamatergic sensory pathways in thalamus and cortex. *J Physiol*. 591:3125-3131.
- Pierce JP, Lewin GR. 1994. An ultrastructural size principle. *Neuroscience*. 58:441-446.
- Pinault D. 1996. A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological

- control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods*. 65:113-136.
- Pines JL. 1927. Zur Architectonik des Thalamus opticus beim Halbaffen (*Lemur catta*). *J f Psychol u Neurol*. 33:31-72.
- Porrero C, Rodríguez-Moreno J, Quetglas JJ, Smerdou C, Furuta T, Clascá F. 2016. A Simple and Efficient In Vivo Non-viral RNA Transfection Method for Labeling the Whole Axonal Tree of Individual Adult Long-Range Projection Neurons. *Front Neuroanat*. 10:27.
- Purushothaman G, Marion RT, Li K, Casagrande VA. 2012. Gating and control of primary visual cortex by pulvinar. *Nat Neurosci*. 15:905-912.
- Rausell E, Bae CS, Viñuela A, Huntley GW, Jones EG. 1992. Calbindin and parvalbumin cells in monkey VPL thalamic nucleus: distribution, laminar cortical projections, and relations to spinothalamic terminations. *J Neurosci*. 12:4088-4111.
- Rausell E, Jones EG. 1991a. Histochemical and immunocytochemical compartments of the thalamic VPM nucleus in monkeys and their relationship to the representational map. *J Neurosci*. 11:210-225.
- Rausell E, Jones EG. 1991b. Chemically distinct compartments of the thalamic VPM nucleus in monkeys relay principal and spinal trigeminal pathways to different layers of the somatosensory cortex. *J Neurosci*. 11:226-237.
- Ray JP, Price JL. 1993. The organization of projections from the mediodorsal nucleus of the thalamus to orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys - Ray - 2004 - *The Journal of Comparative Neurology* - Wiley Online Library. *JComp Neurol*. 337:1-31.
- Reichova I, Sherman SM. 2004. Somatosensory corticothalamic projections: distinguishing drivers from modulators. *J Neurophysiol*. 92:2185-2197.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. 2000. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods*. 103:23-37.
- Rico B, Cavada C. 1998. Adrenergic innervation of the monkey thalamus: an immunohistochemical study. *Neuroscience*. 84:839-847.
- Roberts AC, Tomic DL, Parkinson CH, Roeling TA, Cutter DJ, Robbins TW, Everitt BJ. 2007. Forebrain connectivity of the prefrontal cortex in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): an anterograde and retrograde tract-tracing study. *J Comp Neurol*. 502:86-112.
- Roberts TS, Akert K. 1963. Insular and opercular cortex and its thalamic projection in *Macaca mulatta*. *Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiatr*. 92:1-43.
- Robinson DL, Petersen SE. 1992. The pulvinar and visual salience. *Trends Neurosci*. 15:127-132.



- Rockland KS. 2002. Visual cortical organization at the single axon level: a beginning. *Neurosci Res.* 42:155-166.
- Rockland KS, Andresen J, Cowie RJ, Robinson DL. 1999. Single axon analysis of pulvinocortical connections to several visual areas in the macaque. *J Comp Neurol.* 406:221-250.
- Rockland KS, Pandya DN. 1979. Laminar origins and terminations of cortical connections of the occipital lobe in the rhesus monkey. *Brain Res.* 179:3-20.
- Romanski LM, Giguere M, Bates JF, Goldman-Rakic PS. 1997. Topographic organization of medial pulvinar connections with the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 379:313-332.
- Rosa MGP, Palmer SM, Gamberini M, Burman KJ, Yu H-H, Reser DH, Bourne JA, Tweeddale R, Galletti C. 2009. Connections of the dorsomedial visual area: pathways for early integration of dorsal and ventral streams in extrastriate cortex. *J Neurosci.* 29:4548-4563.
- Rose JE, Woolsey CN. 1949. Organization of the mammalian thalamus and its relationships to the cerebral cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1:391-403-4.
- Rouiller EM, Welker E. 2000. A comparative analysis of the morphology of corticothalamic projections in mammals. *Brain Res Bull.* 53:727-741.
- Rovo Z, Ulbert I, Acsady L. 2012. Drivers of the Primate Thalamus. *J Neurosci.* 32:17894-17908.
- Royce GJ, Bromley S, Gracco C, Beckstead RM. 1989. Thalamocortical connections of the rostral intralaminar nuclei: an autoradiographic analysis in the cat. *J Comp Neurol.* 288:555-582.
- Rubio-garrido JP, Pérez-de-Manzo F, Porrero C, Galazo MJ, Clascá F. 2009. Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cereb Cortex.* 19:2380-2395.
- Rubio-Garrido P, Pérez-de-Manzo F, Clascá F. 2007. Calcium-binding proteins as markers of layer-I projecting vs. deep layer-projecting thalamocortical neurons: A double-labeling analysis in the rat. *Neuroscience.* 149:242-250.
- Rubio-Garrido P, Perez-de-Manzo F, Porrero C, Galazo MJ, Clasca F. 2009. Thalamic Input to Distal Apical Dendrites in Neocortical Layer 1 Is Massive and Highly Convergent. *Cereb Cortex.* 19:2380-2395.
- Saalmann YB, Kastner S. 2011. Cognitive and Perceptual Functions of the Visual Thalamus. *Neuron.* 71:209-223.
- Saalmann YB, Kastner S. 2013. A role for the pulvinar in social cognition (commentary on Nguyen et al.). *Eur J Neurosci.* 37:33-34.
- Saalmann YB, Pinsk MA, Wang L, Li X, Kastner S. 2012. The pulvinar regulates information transmission between cortical areas based on attention demands. *Science.* 337:753-756.

- Sadikot AF, Parent A, François C. 1990. The centre médian and parafascicular thalamic nuclei project respectively to the sensorimotor and associative-limbic striatal territories in the squirrel monkey. *Brain Res.* 510:161-165.
- Sadikot AF, Parent A, François C, Smith Y, Bolam JP. 1992. Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: A PHA-L study of subcortical projections. *J Comp Neurol.* 315:228-242.
- Sánchez-González MA, García-Cabezas MA, Rico B, Cavada C. 2005. The primate thalamus is a key target for brain dopamine. *J Neurosci.* 25:6076-6083.
- Scheibel ME, Scheibel AB. 1958. Structural substrates for integrative patterns in the brain stem reticular core. En: Jasper, Herbert; Proctor, L. D.; Knighton, R. S., Nosahy, W. S.; Costello RT, editor. *Reticular formation of the brain.* Boston. p. 31-55.
- Scheibel ME, Scheibel AB. 1968. The Brain Stem Reticular Core—An Integrative Matrix. En: *Systems Theory and Biology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 261-285.
- Schmahmann JD, Pandya DN. 1990. Anatomical investigation of projections from thalamus to posterior parietal cortex in the rhesus monkey: A WGA-HRP and fluorescent tracer study. *J Comp Neurol.* 295:299-326.
- Schmahmann JD, Pandya DN. 2006. *Fiber Pathways of the Brain.* Oxford University Press.
- Schofield BR. 2008. Retrograde Axonal Tracing with Fluorescent Markers. 1-24.
- Schofield BR, Schofield RM, Sorensen KA, Motts SD. 2007. On the use of retrograde tracers for identification of axon collaterals with multiple fluorescent retrograde tracers. *Neuroscience.* 146:773-783.
- Sherman SM. 2012. Thalamocortical interactions. *Curr Opin Neurobiol.* 22:575-579.
- Sherman SM. 2017. Functioning of Circuits Connecting Thalamus and Cortex. En: *Comprehensive Physiology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley y Sons, Inc. p. 713-739.
- Sherman SM, Guillery RW. 1996. Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol.* 76:1367-1395.
- Sherman SM, Guillery RW. 2011. Distinct functions for direct and transthalamic corticocortical connections. *J Neurophysiol.* 106:1068-1077.
- Sherman SM, Guillery RW, Sherman SM. 2006. *Exploring the thalamus and its role in cortical function.* MIT Press.
- Sheskin DJ. 2003. *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures: Third Edition* (Google eBook). CRC Press.

- Shibata H, Yukie M. 2003a. Differential thalamic connections of the posteroventral and dorsal posterior cingulate gyrus in the monkey. *Eur J Neurosci*. 18:1615-1626.
- Shinoda Y, Kakei S. 1989. Distribution of terminals of thalamocortical fibers originating from the ventrolateral nucleus of the cat thalamus. *Neurosci Lett*. 96:163-167.
- Shipp S. 2001. Corticopulvinar connections of areas V5, V4, and V3 in the macaque monkey: a dual model of retinal and cortical topographies. *J Comp Neurol*. 439:469-490.
- Shipp S. 2003. The functional logic of cortico-pulvinar connections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 358:1605-1624.
- Shu SY, Ju G, Fan LZ. 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett*. 85:169-171.
- Soares JG, Gattass R, Souza AP, Rosa MGP, Fiorani M, Brandão BL. 2001. Connectional and neurochemical subdivisions of the pulvinar in Cebus monkeys. *Vis Neurosci*. 18:25-41.
- Standage GP, Benevento LA. 1983. The organization of connections between the pulvinar and visual area MT in the macaque monkey. *Brain Res*. 262:288-294.
- Steele GE, Weller RE. 1993. Subcortical connections of subdivisions of inferior temporal cortex in squirrel monkeys. *Vis Neurosci*. 10:563.
- Stepniewska I. 2003. The Pulvinar Complex. En: Kaas JH,, Collins CE, editores. *The Primate Visual System*. Frontiers in Neuroscience. Ilustrada. ed. CRC Press. p. 440.
- Stepniewska I, Kaas JH. 1997. Architectonic subdivisions of the inferior pulvinar in New World and Old World monkeys. *Vis Neurosci*. 14:1043-1060.
- Stepniewska I, Qi HX, Kaas JH. 2000. Projections of the superior colliculus to subdivisions of the inferior pulvinar in New World and Old World monkeys. *Vis Neurosci*. 17:529-549.
- Subramanian T, Deogaonkar M, Brummer M, Bakay R. 2005. MRI guidance improves accuracy of stereotaxic targeting for cell transplantation in parkinsonian monkeys. *Exp Neurol*. 193:172-180.
- Trojanowski JQ, Jacobson S. 1974. Medial pulvinar afferents to frontal eye fields in rhesus monkey demonstrated by horseradish peroxidase. *Brain Res*. 80:395-411.
- Trojanowski JQ, Jacobson S. 1975. A combined horseradish peroxidase-autoradiographic investigation of reciprocal connections between superior temporal gyrus and pulvinar in squirrel monkey. *Brain Res*. 85:347-353.
- Trojanowski JQ, Jacobson S. 1976a. Areal and laminar distribution of some pulvinar cortical efferents in rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 169:371-392.

- Trojanowski JQ, Jacobson S. 1977a. The morphology and laminar distribution of cortico-pulvinar neurons in the Rhesus monkey. *Exp Brain Res.* 28-28:51-62.
- Ungerleider LG, Desimone R, Galkin TW, Mishkin M. 1984. Subcortical projections of area MT in the macaque. *J Comp Neurol.* 223:368-386.
- Ungerleider LG, Galkin TW, Mishkin M. 1983. Visuotopic organization of projections from striate cortex to inferior and lateral pulvinar in rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 217:137-157.
- Van Essen DC. 2005. Corticocortical and thalamocortical information flow in the primate visual system. *Prog Brain Res.* 149:173-185.
- Van Essen DC, Gallant JL. 1994. Neural mechanisms of form and motion processing in the primate visual system. *Neuron.* 13:1-10.
- Van Horn SC, Sherman SM. 2007. Fewer driver synapses in higher order than in first order thalamic relays. *Neuroscience.* 146:463-470.
- Van Le Q, Isbell LA, Matsumoto J, Nguyen M, Hori E, Maior RS, Tomaz C, Tran AH, Ono T, Nishijo H. 2013. Pulvinar neurons reveal neurobiological evidence of past selection for rapid detection of snakes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:19000-19005.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. 2011a. Properties of the thalamic projection from the posterior medial nucleus to primary and secondary somatosensory cortices in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:18156-18161.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. 2011b. Synaptic properties of thalamic input to the subgranular layers of primary somatosensory and auditory cortices in the mouse. *J Neurosci.* 31:12738-12747.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. 2011c. Synaptic properties of thalamic input to layers 2/3 and 4 of primary somatosensory and auditory cortices. *J Neurophysiol.* 105:279-292.
- Vogt BA, Vogt L, Farber NB, Bush G. 2005. Architecture and neurocytology of monkey cingulate gyrus. *J Comp Neurol.* 485:218-239.
- Vogt C. 1909. La myéloarchitecture du thalamus du cercopithèque. Leipzig.
- Walker AE. 1936. An experimental study of the thalamo-cortical projection of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 64:1-39.
- Walker AE. 1938. The thalamus of the chimpanzee. II. Its nuclear structure, normal and following hemidecortication. *J Comp Neurol.* 69:487-507.
- Ward R, Arend I. 2007. An object-based frame of reference within the human pulvinar. *Brain.* 130:2462-2469.

- Ward R, Calder AJ, Parker M, Arend I. 2007. Emotion recognition following human pulvinar damage, *Neuropsychologia*.
- Warner CE, Goldshmit Y, Bourne JA. 2010. Retinal afferents synapse with relay cells targeting the middle temporal area in the pulvinar and lateral geniculate nuclei. *Front Neuroanat*. 4:8.
- Warner CE, Kwan WC, Bourne JA. 2012. The Early Maturation of Visual Cortical Area MT is Dependent on Input from the Retinorecipient Medial Portion of the Inferior Pulvinar. *J Neurosci*. 32:17073-17085.
- Webster MJ, Bachevalier J, Ungerleider LG. 1993. Subcortical connections of inferior temporal areas TE and TEO in macaque monkeys. *J Comp Neurol*. 335:73-91.
- Webster MJ, Bachevalier J, Ungerleider LG. 1994. Connections of inferior temporal areas TEO and TE with parietal and frontal cortex in macaque monkeys. *Cereb Cortex*. 4:470-483.
- Webster MJ, Ungerleider LG, Bachevalier J. 1991. Connections of inferior temporal areas TE and TEO with medial temporal-lobe structures in infant and adult monkeys. *J Neurosci*. 11:1095-1116.
- Weller RE, Steele GE, Kaas JH. 2002. Pulvinar and other subcortical connections of dorsolateral visual cortex in monkeys. *J Comp Neurol*. 450:215-240.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec*. 231:482-497.
- White EL, Weinfeld E, Lev DL. 2004. Quantitative analysis of synaptic distribution along thalamocortical axons in adult mouse barrels. *J Comp Neurol*. 479:56-69.
- Wilke M, Mueller K-M, Leopold DA. 2009. Neural activity in the visual thalamus reflects perceptual suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:9465-9470.
- Wilke M, Turchi J, Smith K, Mishkin M, Leopold DA. 2010. Pulvinar inactivation disrupts selection of movement plans. *J Neurosci*. 30:8650-8659.
- Wong-Riley M. 1979. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res*. 171:11-28.
- Wong-Riley MTT, Norton TT. 1988. Histochemical localization of cytochrome oxidase activity in the visual system of the tree shrew: Normal patterns and the effect of retinal impulse blockage. *J Comp Neurol*. 272:562-578.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP. 1990. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: Light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracerPhaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 296:179-203.
- Yeterian EH, Pandya DN. 1989. Thalamic connections of the cortex of the superior temporal sulcus in the

- rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 282:80-97.
- Zhong Y-M. 2003. Inferior Parietal Lobule Projections to Anterior Inferotemporal Cortex (Area TE) in Macaque Monkey. *Cereb Cortex.* 13:527-540.
- Zikopoulos B, Barbas H. 2007a. Parallel driving and modulatory pathways link the prefrontal cortex and thalamus. *PLoS One.*
- Zikopoulos B, Barbas H. 2007b. Circuits formultisensory integration and attentional modulation through the prefrontal cortex and the thalamic reticular nucleus in primates. *Rev Neurosci.* 18:417-438.
- Zikopoulos B, Barbas H. 2012. Pathways for emotions and attention converge on the thalamic reticular nucleus in primates. *J Neurosci.* 32:5338-5350.